

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES
ENG1 Y ENG2 DE CANDIDA ALBICANS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Inmaculada Ríos Serrano

Bajo la dirección de los Doctores:

Miguel Sánchez Pérez
Jesús Pla Alonso

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2038-2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *ENG1* Y
ENG2 DE *Candida albicans*.**

Dña. INMACULADA RÍOS SERRANO

Madrid, 2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *ENG1* Y
ENG2 DE *Candida albicans*.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por:

Dña. INMACULADA RÍOS SERRANO

Directores:

Dr. MIGUEL SÁNCHEZ PÉREZ

Dr. JESÚS PLA ALONSO

Madrid, Diciembre de 2001

D. RAFAEL ROTGER ANGLADA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que Dña. INMACULADA RÍOS SERRANO ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Miguel Sánchez Pérez y el Dr. D Jesús Pla Alonso, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia con el título: "CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *ENG1* Y *ENG2* DE *Candida albicans*".

Y para que conste, firmo la presente certificación en Madrid a 27 de Noviembre de 2001.

Fdo.: Prof. Dr. D. Rafael Rotger Anglada.

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

Beca adscrita al proyecto "Identificación de funciones biológicas en hongos patógenos que puedan servir como dianas para nuevos antifúngicos" suscrito entre el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la U.C.M. y Glaxo S.A. (junio de 1995 a enero de 1997).

Beca Predoctoral de Formación de Profesorado Universitario otorgada por el Ministerio de Educación y Cultura (enero de 1997 a diciembre de 2000).

Beca adscrita al proyecto de la Comunidad de Madrid "Grupos Estratégicos CAM" (mayo de 2001 a diciembre de 2001).

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	11
CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS	12
INTRODUCCIÓN	15
I. LA PARED CELULAR FÚNGICA.	15
1. Generalidades	15
2. Composición y organización molecular	15
2.1. β -1,3-glucano	17
2.2. β -1,6-glucano	19
2.3. Quitina	21
2.4. Manoproteínas	24
2.4.1. Proteínas unidas no covalentemente o unidas mediante puentes disulfuro a la pared celular	24
2.4.2. Proteínas unidas covalentemente a la pared celular	25
A) Proteínas GPI	25
B) Proteínas Pir	26
2.5. Modelo modular de organización de la pared celular	26
2.6. Ensamblaje de los componentes de la pared celular	28
2.7. Mecanismo compensatorio	29
3. Regulación y mantenimiento de la integridad celular	31
A) Ruta PKC o de integridad celular	31
B) Ruta SVG	33
C) Ruta HOG o de respuesta a alta osmolaridad	33
II. ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE LA PARED CELULAR: GLICOSIDASAS.	35
Quitinasas	35
Mananasas	36
Glucanasas	36
A) Exo- β -glucanasas	38
B) Endo- β -glucanasas	41
III. <i>Candida albicans</i> COMO AGENTE PATÓGENO.	47
Factores de virulencia	49
Terapia antifúngica	50
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Microorganismos, condiciones de cultivo y determinación del crecimiento	55
2. Medios de cultivo	57
3. Técnicas de biología molecular y construcción de plásmidos	58
3.1. Plásmidos utilizados	59

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	60
3.3. Oligonucleótidos y condiciones de la PCR.	60
3.4. Construcción del plásmido pIR3.	61
3.5. Construcción empleada en la delección de <i>CaENG2</i> .	62
3.6. Construcción del plásmido pIR-ENG1.	63
3.7. Construcción del plásmido pIR7.	64
4. Ensayos de filamentación de <i>C. albicans</i> .	65
4.1. Medio líquido.	65
4.2. Medio sólido.	65
4.3. Invasividad en placa.	65
5. Determinación de la sensibilidad a la toxina <i>killer k-500</i> .	65
6. Ensayo de sensibilidad a zimoliasa.	66
7. Ensayo de sensibilidad a distintos agentes que interfieren con el metabolismo celular mediante determinación de la CMI.	66
8. Ensayos de sensibilidad en placa.	67
9. Técnicas de citometría de flujo.	68
10. Valoración de la actividad exoglucanasa.	68
11. Ensayo de virulencia en un modelo murino.	69
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	73
RESULTADOS	77
1. Características de la secuencia nucleotídica del gen <i>CaENG1</i> .	77
2. Características de la secuencia proteica <i>CaEng1p</i> .	81
3. Delección del gen <i>ENG1</i> en <i>Candida albicans</i> .	84
4. Caracterización fenotípica de la cepa carente del gen <i>ENG1</i> .	87
4.1. Crecimiento en medio líquido y morfología celular.	87
4.2. Estudio de la transición morfológica.	88
A) Filamentación en medio líquido.	88
B) Morfología colonial e invasividad en placa.	89
4.3. Arquitectura de la pared celular.	92
A) Sensibilidad a la toxina <i>killer K-500</i> de <i>Williopsis mrakii</i> .	92
B) Sensibilidad a antifúngicos y distintos agentes que interfieren con el metabolismo celular.	93
C) Sensibilidad a zimoliasa.	94
4.4. Análisis fenotípico mediante citometría de flujo.	95
4.5. Virulencia en un modelo murino.	97
5. Características de la secuencia nucleotídica del gen <i>CaENG2</i> .	99
6. Características de la secuencia proteica <i>CaEng2p</i> .	102
7. Delección del gen <i>ENG2</i> en <i>Candida albicans</i> . construcción de cepas $\Delta eng1 \Delta eng2$.	104
8. Interrupción del gen <i>XOG1</i> en <i>Candida albicans</i> . construcción de cepas $\Delta eng1 xog1$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$.	106
9. Reintegración del gen <i>ENG1</i> en la cepa $\Delta eng1 xog1$.	111
10. Reintegración del gen <i>ENG1</i> bajo el promotor de actina, en la cepa $\Delta eng1 xog1$.	113

11. Reintegración del gen <i>ENG1</i> en la cepa $\Delta eng1 \Delta eng2$	115
12. Comparación de <i>ENG1</i> y <i>ENG2</i> con otras glucanasas.	116
13. Caracterización fenotípica de los mutantes $\Delta eng1 xog1$, $\Delta eng1 \Delta eng2$, y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$	124
13.1. Capacidad de crecimiento en medio líquido y morfología celular.....	124
13.2. Estudio de la transición morfológica.....	125
A) Filamentación en STF.....	125
B) Morfología colonial, e invasividad en placa.	128
13.3. Virulencia en un modelo murino.....	130
13.4. Arquitectura de la pared celular.....	134
A) Sensibilidad a la toxina <i>killer</i> K-500 de <i>Williopsis mrakii</i>	134
B) Sensibilidad a zimoliasa.	135
C) Sensibilidad a antifúngicos y distintos agentes que interfieren con el metabolismo celular.....	137
D) Sensibilidad a compuestos que interfieren con la integridad de la pared celular.....	139
DISCUSIÓN	151
1. Clonación y delección de los genes <i>CaENG1</i> y <i>CaENG2</i>	152
2. Relación de los genes <i>CaENG1</i> y <i>CaENG2</i> con la pared celular.	155
3. El papel de <i>CaENG1</i> y <i>CaENG2</i> en la transición dimórfica y en la virulencia.	159
4. Análisis <i>in silicio</i> de <i>CaENG1</i> y <i>CaENG2</i> : una nueva familia de β -glucanasas.....	162
5. Consideraciones finales.....	165
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
ANEXO	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la pared celular fúngica.....	16
Figura 2: Esquema de las uniones entre las proteínas GPI y Pir y los demás componentes de la pared celular.	25
Figura 3: Modelo modular de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 4: Orden cronológico de la síntesis del β -1,3-glucano y posterior entrecruzamiento con los otros polímeros de la pared celular.....	29
Figura 5: Modelo propuesto para la ruta de integridad celular.	32
Figura 6: Modelo propuesto para la ruta SVG de mantenimiento de la integridad de la pared celular.	33
Figura 7: Ruta de respuesta a choque osmótico o ruta HOG.....	34
Figura 8: Actividad exo y endo hidrolítica de las glucanasas.	37
Figura 9: Exo-1,3- β -glucanasas de levaduras. Familia 5 de glicosilhidrolasas.	40
Figura 10: Transición dimórfica de <i>C. albicans</i>	48
Figura 11: Construcción del plásmido pIR3.	61
Figura 12: Construcción empleada en la delección de <i>ENG2</i>	62
Figura 13: Construcción del plásmido pIR-ENG1.	63
Figura 14: Construcción del plásmido pIR7.	64
Figura 15: Bloques de homología utilizados para el diseño de los oligonucleótidos degenerados oligo1 y oligo2.....	77
Figura 16: Secuencia nucleotídica del gen <i>ENG1</i> y secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica.....	78
Figura 17: Características de la secuencia proteica Eng1p.....	83
Figura 18: Mapa físico del gen <i>ENG1</i>	85
Figura 19: Estrategia de interrupción del gen <i>ENG1</i>	85
Figura 20: (A) Comprobación de la interrupción del primer alelo del gen <i>ENG1</i> mediante PCR y (B) análisis de las cepas con un alelo y dos alelos del gen <i>ENG1</i> delecionados, mediante hibridación DNA-DNA.	86
Figura 21: Curvas de crecimiento en medio líquido.....	88
Figura 22: Ensayo de filamentación en 100 % de STF.....	89
Figura 23: Morfología colonial en medios SLAD, Spider y medio de Lee.	91
Figura 24: Invasividad en placa en medio Spider y medio de Lee.	91
Figura 25: Sensibilidad a las toxinas <i>killer</i> K-500 y HM-1 de <i>W. mrakii</i>	93
Figura 26: Sensibilidad a zimoliasa.....	95
Figura 27: Análisis de la viabilidad celular, contenido de proteínas y lípidos totales, potencial de membrana mitocondrial y actividad peroxidasa citosólica.....	96
Figura 28: Porcentaje de supervivencia de los ratones en el transcurso de la infección.....	98
Figura 29: Alojamiento de las distintas cepas ensayadas en riñón y cerebro.	99
Figura 30: Secuencia nucleotídica del gen <i>ENG2</i> y secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica.....	100
Figura 31: Características de la secuencia proteica Eng2p.....	103
Figura 32: Estrategia de interrupción del gen <i>ENG2</i>	105
Figura 33: Comprobación de la interrupción del gen <i>ENG2</i> por hibridación DNA-DNA.....	105

Figura 34: Estrategia de interrupción del gen <i>XOG1</i> .	107
Figura 35: Comprobación mediante PCR de la interrupción del primer alelo del gen <i>XOG1</i> .	108
Figura 36: Comprobación mediante PCR de la expulsión del gen <i>URA3</i> .	109
Figura 37: Comprobación de la interrupción del segundo alelo <i>XOG1</i> mediante observación de la hidrólisis de MUG.	110
Figura 38: Comprobación de la interrupción del gen <i>XOG1</i> por hibridación DNA-DNA.	111
Figura 39: Estrategia de reintegración del gen <i>ENG1</i> .	112
Figura 40: Comprobación mediante PCR de la reintegración del gen <i>ENG1</i> .	112
Figura 41: Reintegración del gen <i>ENG1</i> bajo el promotor de actina.	114
Figura 42: Comprobación mediante PCR de la reintegración de <i>ENG1</i> .	114
Figura 43: Comprobación por PCR de la integración de <i>ENG1</i> .	116
Figura 44: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CaEng1p, CaEng2p, ScEng1p, ScEng2p, SpEng3p, SpEng2p y Eng1p.	117
Figura 45: Dendrograma del alineamiento de diferentes 1,3- β -endoglucanasas de levaduras.	122
Figura 46: Dominios de las endo- β -1,3-glucanasas.	123
Figura 47: Curvas de crecimiento en medio líquido.	125
Figura 48: Transición morfológica en medio líquido con STF.	127
Figura 49: Morfología colonial en MM, MM+10 % STF, YPD, SLAD, Spider y medio de Lee.	129
Figura 50: Invasividad en MM+10 % STF, YPD, SLAD y Spider.	130
Figura 51: Porcentaje de supervivencia de los ratones a lo largo de la infección.	132
Figura 52: Capacidad de colonización de las cepas de levadura en el riñón y el cerebro del ratón.	134
Figura 53: Sensibilidad a la toxina <i>killer</i> K-500 de <i>Williopsis mrakii</i> .	135
Figura 54: Sensibilidad a zimoliasa 20T (50 μ g.mL ⁻¹).	135
Figura 55: Sensibilidad a zimoliasa 20T.	136
Figura 56: Sensibilidad a rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS.	141
Figura 57: Sensibilidad a compuestos que afectan a la integridad de la pared celular en la cepa reintegrante <i>ENG1 Δeng1 xog1</i> .	143
Figura 58: Sensibilidad a rojo Congo y SDS de las cepas <i>ACT1^{PR}-ENG1 Δeng1 xog1</i> y de la cepa <i>Δeng1 Δeng2 xog1</i> .	145
Figura 59: Sensibilidad de todos los mutantes obtenidos a los compuestos rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS.	147
Figura 60: Bloque de histidinas: D-H-H-H-Y.	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Relación de las glucanasas descritas en <i>S. cerevisiae</i> y en <i>C. albicans</i> .	46
Tabla 2: Cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas en este trabajo.	55
Tabla 3: Cepas de <i>C. albicans</i> obtenidas en este trabajo.	56
Tabla 4: Medios de cultivo empleados.	57
Tabla 5: Plásmidos originales empleados en este trabajo.	59
Tabla 6: Plásmidos obtenidos durante la realización de este trabajo.	59

Tabla 7: Oligonucleótidos cebadores usados en este trabajo.	60
Tabla 8: Antifúngicos ensayados.....	66
Tabla 9: Compuestos utilizados en los ensayos de sensibilidad en placa.....	67
Tabla 10: Fluorocromos utilizados en este trabajo.....	68
Tabla 11: Sensibilidad a compuestos antifúngicos mediante determinación de la CMI.	94
Tabla 12: Sensibilidad a distintos agentes mediante determinación de la CMI.	138
Tabla 13: Resistencia/sensibilidad a nikomicina Z.....	139
Tabla 14: Sensibilidad a rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS de los mutantes afectados en los genes <i>XOG1</i> y <i>ENG1</i>	140
Tabla 15: Sensibilidad a compuestos que afectan a la integridad de la pared celular en la cepa reintegrante <i>ENG1 Δeng1 xog1</i>	142
Tabla 16: Sensibilidad a rojo Congo y SDS de las cepas <i>ACT1^{PR}-ENG1 Δeng1 xog1</i> y de la cepa <i>Δeng1 Δeng2 xog1</i>	144
Tabla 17: Sensibilidad de todos los mutantes obtenidos a los compuestos rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS.	146
Tabla 18: Fenotipos observados en la caracterización de los diversos mutantes.	155

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Δ	delección
μ	micro
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
A	absorbancia
aa	aminoácido
ARS	secuencia de replicación autónoma (<i>Autonomous Replication Sequence</i>)
°C	grados centígrados
Ca	<i>Candida albicans</i> (delante de genes o proteínas)
cél.	Células
cm	centímetros
CMI	concentración mínima inhibitoria
cols.	colaboradores
CS	quitina sintasa
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	densidad óptica
5-FOA	ácido 5-fluoroorótico
g	gramos
GFP	proteína verde fluorescente
GPI	glicosil fosfatidil inositol
h	horas
HCA	análisis de grupos hidrofóbicos (<i>Hydrophobic Cluster Analysis</i>)
kb	kilobases
kDa	kiloDalton
L	litro
M	molar
min.	minutos
mg	miligramos
mL	mililitros
mM	milimolar
MUG	4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido
NCYC	<i>National Collection of Yeast Cultures</i>
nm	nanómetros
ORF	marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pir	un tipo de proteínas unidas covalentemente a la pared celular (<i>Proteins with Internal Repeats</i>)
PH	dominio tipo plectrina (<i>Plekstrin Homology domain</i>)

Abreviaturas

pNPG	para-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
RCM	<u>R</u> egión de <u>C</u> lonación <u>M</u> últiple
RE	retículo endoplásmico
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	medio rico diseñado para el crecimiento de células animales
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (delante de genes o proteínas)
SDS	dodecil sulfato sódico
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (delante de genes o proteínas)
STF	<u>S</u> uero de <u>T</u> ernera <u>F</u> etal
tg	tiempo de generación
UFC	<u>U</u> nidades <u>F</u> ormadoras de <u>C</u> olonias
UV	ultravioleta
v/v	volumen en volumen

CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS

Ala	A	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Ácido Aspártico
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Ácido glutámico
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptófano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. LA PARED CELULAR FÚNGICA.

1. Generalidades.

La pared celular fúngica es una estructura rígida que rodea la célula por la parte externa de la membrana plasmática y que es esencial para el mantenimiento de la integridad celular. Esta estructura constituye entre el 15 y el 30 % del peso seco de la célula y proporciona un soporte mecánico que la protege de los efectos adversos derivados de los cambios de osmolaridad externa. También determina su forma, tanto durante el ciclo vegetativo de la célula como durante los procesos de apareamiento, esporulación, formación de pseudohifas y filamentación e invasión en hongos miceliares. La pared celular, además, regula la entrada selectiva de moléculas, actuando como un filtro y media las interacciones entre células en procesos como la aglutinación sexual, la floculación y la adhesión a tejidos del hospedador para modular la respuesta inmune del mismo. Desde el punto de vista molecular, esta estructura rígida y aparentemente estática es realmente muy dinámica, sufriendo modificaciones importantes a lo largo del ciclo celular o de procesos como la emergencia de la yema, el crecimiento del *shmoo* y el apareamiento, la formación del septo, la separación celular, la esporulación y las transiciones morfológicas. Todas estas alteraciones requieren una regulación precisa, de manera que la síntesis y la degradación de los polímeros que constituyen la pared celular estén equilibradas y el transporte de los componentes de la pared esté dirigido a los lugares donde éstos son requeridos. Por ello, los procesos de biosíntesis de la pared celular responden a controles de ciclo celular y a señales medioambientales (ver Cid *et al.* 1995; Orlean 1997 y Smits *et al.* 1999 para revisiones recientes).

La biosíntesis y el ensamblaje de la pared celular presentan un considerable interés desde el punto de vista farmacéutico. Puesto que la pared es una estructura esencial para las células y dada su ausencia en eucariotas superiores, un conocimiento más profundo de la misma podría conducir a la identificación de potenciales dianas para el desarrollo de agentes antifúngicos de acción selectiva (Orlean 1997).

2. Composición y organización molecular.

Se conoce con cierto detalle la composición química de esta estructura, aun cuando la comprensión de aspectos como la interacción de los distintos componentes y su ensamblaje es aún limitada. La levadura en la que más se ha estudiado la pared celular es *Saccharomyces cerevisiae* y por este motivo las características generales de la organización y regulación de los componentes de la pared celular expuestas en esta introducción se referirán fundamentalmente a este microorganismo. Es importante

indicar, sin embargo, que aunque muchas de ellas son compartidas por otros hongos, pueden existir diferencias importantes específicas en cada microorganismo.

La pared celular está constituida principalmente por tres macromoléculas: **β -glucano** (formado por enlaces β -1,3, β -1,6, o ambos), **quitina** y **manoproteínas**, los cuales representan el 50-60 %, 1-2-% y 35-40 % del peso seco de la célula respectivamente. Esta estructura está dispuesta en capas, según se observa mediante microscopía electrónica de transmisión, con una región externa muy electrodensa de aspecto fibrilar y muy rica en manoproteínas, y una capa interna amorfa, constituida básicamente por β -1,3-glucano, que a su vez consta de dos zonas, una interior menos amorfa, enfrentada a la membrana plasmática y rica en proteínas y una más externa que parece contener una proporción importante de β -1,6-glucano (Figura 1) (Cid *et al.* 1995 y Orlean 1997). Todos estos componentes están unidos entre sí mediante enlaces covalentes (Kollár *et al.* 1997).

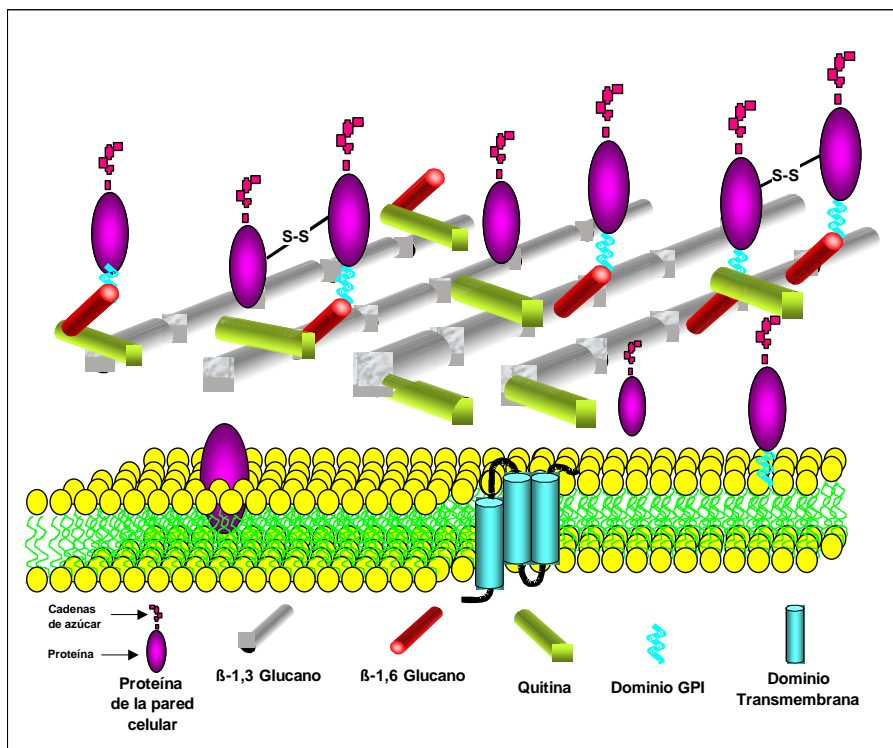


Figura 1: Representación esquemática de la pared celular fúngica.

Reproducido de Molina *et al.* 2000.

2.1. β -1,3-glucano.

El β -1,3-glucano es el componente **más abundante** de la pared celular, constituyendo el 35 % del peso seco de ésta. Forma parte de la región interna amorfa anteriormente citada. Este polímero está compuesto por cadenas de unas **1500 unidades de glucosa** unidas mediante **enlaces β -1,3-O-glicosídicos** y contiene en torno a un **3 % de ramificaciones mediante enlaces β -1,6** (Lipke and Ovalle 1998). Junto a la quitina es responsable de mantener la **rigidez e integridad** de la pared celular (Cid *et al.* 1995). El β -1,3-glucano puede estar unido a través de sus extremos no reductores a β -1,6-glucano, a quitina o a ambos (Kollár *et al.* 1997 y Kollár *et al.* 1995). La unión entre el residuo reductor terminal de una cadena de quitina y el extremo no reductor de una cadena de β -1,3-glucano parece ser responsable de la insolubilidad de este polímero en álcali (Kollár *et al.* 1995).

La síntesis de β -1,3-glucano es catalizada por la enzima **β -1,3-glucano sintasa**, cuya actividad se localiza en la **membrana plasmática**. Esta enzima cataliza la transferencia de unidades de glucosa desde la UDP-glucosa hasta una cadena de residuos unidos por enlaces β -1,3. La enzima β -1,3-glucano sintasa está constituida por una subunidad catalítica codificada por los genes *FKS1* y *FKS2* y una subunidad regulatoria codificada por el gen *RHO1*. El gen *FKS1* fue clonado simultáneamente por varios grupos, empleando distintas estrategias como la búsqueda de mutantes que confiriesen hipersensibilidad a algunos compuestos, resistencia a otros, y también a partir de los datos de secuencia primaria obtenidos tras la purificación parcial de la enzima (Orlean 1997). Se han descrito mutantes *fks1* que tienen reducida la cantidad de β -1,3-glucano en un 75 %, crecen lentamente y su actividad β -1,3-glucano sintasa *in vitro* está muy reducida. Además manifiestan hipersensibilidad a nikomicina Z, un inhibidor de la quitina sintasa, lo que sugeriría que estas células serían más dependientes de quitina para mantener la pared celular (el-Sherbeini and Clemas 1995). *FKS2* codifica una proteína responsable de la actividad glucano sintasa residual, es idéntica a Fks1p en un 88 % y fue identificada por hibridación cruzada con su homólogo *FKS1* (Mazur *et al.* 1995) y porque copurifica con Fks1p (Inoue *et al.* 1995). Los mutantes *fks2* no presentan defectos en crecimiento vegetativo pero sí en esporulación, mientras que los dobles mutantes *fks1 fks2* son letales. A pesar de la elevada similitud entre Fks1p y Fks2p, la regulación es diferente y cada proteína podría ser un componente de uno de los dos complejos de síntesis del β -1,3-glucano con funciones que se solapan parcialmente (Inoue *et al.* 1995; Mazur *et al.* 1995). En *C. albicans* se han clonado tres genes, *GSC1*, *GLS1* y *GLS2* con una homología significativa, tanto en su secuencia de DNA como de proteína, con los genes *GSC1/FKS1* y *GSC2/FKS2* de *S. cerevisiae* y *FKSA* de *A. nidulans*. *CaGSC1* o *CaFKS1* es una proteína transmembrana que se expresa preferentemente en células levaduriformes. Parecen existir tres copias del gen en el genoma de la cepa CAI4 de *C. albicans* y sólo se han podido interrumpir dos de las tres copias, lo que provoca una reducción de los niveles de β -1,3-glucano en un 50 %. Este hecho sugiere, por tanto,

su carácter esencial (Mio *et al.* 1997a). Respecto a los otros dos genes clonados, se ha detectado mRNA de *GLS1*, pero no de *GLS2* -ni en levaduras ni en hifas-, lo que implicaría que este gen es silencioso y redundante. En la levadura de fisión *S. pombe* se ha descrito el gen *cps1⁺* cuya proteína presenta una elevada homología con Fks1p y Fks2p de *S. cerevisiae*, lo que indicaría la existencia de una subunidad catalítica de la β -1,3-glucano sintasa en esta levadura (Ishiguro *et al.* 1997). Recientemente se ha clonado el gen *FKS1* de *Cryptococcus neoformans* mediante hibridación cruzada con una sonda de su homólogo en *S. cerevisiae* (Thompson *et al.* 1999). Este gen, que aparece en una sola copia, parece ser esencial para la viabilidad del hongo. Se puede concluir, por tanto, que los genes *GSC/FKS* están altamente conservados entre levaduras y hongos y que su función es esencial en el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

La subunidad regulatoria de la β -1,3-glucano sintasa, que fue purificada a partir de preparaciones de membrana con dicha actividad, ha sido identificada como Rho1p, un miembro de la familia de las GTPasas. Rho1p puede regular la actividad β -1,3-glucano sintasa tanto de Fks1p como de Fks2p y coinmunoprecipita con Fks1p (Mazur and Baginsky 1996; Qadota *et al.* 1996) lo que sugiere que estas proteínas podrían interaccionar *in vivo*. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta han revelado que Fks1p y Rho1p colocalizan en el sitio de emergencia de la yema y en la punta de la yema en crecimiento. Los mutantes *rho1* condicionales son hipersensibles a equinocandina y a blanco de calcoflúor (Qadota *et al.* 1996) y frágiles osmóticamente. Rho1p tiene otras dos funciones como regulador de la síntesis de la pared celular y de la morfogénesis: activa la proteína quinasa C (Pkc1p) -que a su vez forma parte de la ruta de transducción de señales que controla la integridad celular- y parece estar también involucrado en la organización del citoesqueleto de actina en la punta de la yema (Orlean 1997). Mediante técnicas de PCR e hibridación cruzada se ha clonado el gen *CaRHO1* de *C. albicans*, cuya proteína tiene una similitud del 82,9 % con Rho1p de *S. cerevisiae*. CaRho1p ha sido copurificada con la subunidad catalítica de la β -1,3-glucano sintasa *CaFKS1* y se ha visto, mediante estudios de entrecruzamiento, que ambas proteínas interaccionan directamente. Estos resultados indican que CaRho1p actúa igual que su homólogo en *S. cerevisiae* respecto a la síntesis del β -1,3-glucano (Kondoh *et al.* 1997).

El uso de la toxina K9 o HM-1 de la levadura *Hansenula mrakii* ha conducido a la clonación de varios genes relacionados con la síntesis del β -1,3-glucano: *KNR4* (Hong *et al.* 1994), cuya delección origina unos mutantes que presentan unos niveles muy reducidos de β -1,3 y β -1,6-glucano, una menor actividad β -1,3-glucano sintasa y un nivel de quitina incrementado. *HKR1*, que ha sido identificado como un gen esencial que cuando es sobreexpresado confiere resistencia a la toxina HM-1 y provoca un aumento de 2,5 veces en la fracción de β -1,3-glucano insoluble, aunque los niveles de actividad *in vitro* de la β -1,3-glucano sintasa permanecen inalterados (Kasahara *et al.* 1994). Mediante la complementación de una mutación que confería resistencia a un análogo de papulocandina, un inhibidor de la síntesis de β -1,3-glucano, se ha clonado también el gen *GNS1* (el-Sherbeini and Clemas 1995),

que interacciona genéticamente con *FKS1*, por lo que se ha propuesto que Gns1p podría ser la subunidad de unión del citado inhibidor a la β -1,3-glucano sintasa. Los mutantes *gns1* muestran una reducción drástica de la actividad β -1,3-glucano sintasa.

2.2. β -1,6-glucano.

Este componente representa el 10 % del peso seco de la pared celular de la levadura. Se trata de un **polímero muy ramificado** constituido por aproximadamente **350 unidades de glucosa** unidas entre sí mediante **enlaces β -1,6** y con una **pequeña proporción de enlaces β -1,3**. El β -1,6-glucano juega un papel fundamental en la estructura de la pared celular porque **enlaza** todos los componentes de la misma (Kapteyn *et al.* 1999a; Kollár *et al.* 1997).

Mediante diferentes aproximaciones genéticas se han identificado la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de este polímero. Dos estrategias han resultado especialmente útiles, la primera de ellas basada en la resistencia a la toxina *killer* K1 de *S. cerevisiae*. Dicha toxina es una proteína que origina poros en la membrana al unirse a un componente de la pared celular asociado al β -1,6-glucano, produciendo la lisis celular. Así, células con menor cantidad de este polímero manifiestan mayor resistencia a la toxina (Hutchins and Bussey 1983). Muchos de los mutantes seleccionados por resistencia a esta toxina (mutantes *kre*, de *Killer Toxin Resistant*), presentan fenotipos interesantes como una disminución en la síntesis de β -1,6-glucano; la presencia de un polímero de glucano de menor tamaño o que carece de ramificaciones β -1,6; la existencia de proporciones alteradas de β -1,3 y β -1,6-glucano; la presencia de alteraciones en la N- y O- glicosilación de proteínas; la disminución del anclaje de algunas proteínas a la pared celular como es el caso de la α -aglutinina (Lu *et al.* 1995) y niveles aumentados de proteínas ancladas a la pared celular vía β -1,3-glucano en vez de β -1,6-glucano, como en el caso de la proteína Pir2p (Kapteyn *et al.* 1999b). La segunda estrategia se ha basado en la hipersensibilidad al blanco de calcoflúor (Ram *et al.* 1994; Lussier *et al.* 1997), que ha llevado a la identificación de mutantes con un elevado número de defectos en la pared celular, ya que cualquier mutante con una pared celular debilitada es sensible a este compuesto. Así se han identificado los genes *CWH* (por *Calcofluor White Hypersensitive*). Tanto los productos génicos de los genes *KRE* como los de *CWH* se han localizado a lo largo de la ruta de secreción y en la superficie celular, sugiriendo una posible ruta biosintética del β -1,6-glucano.

La síntesis del β -1,6-glucano se iniciaría en el **retículo endoplásmico**, paso en el que intervendría Kre5p, hecho apoyado por su localización en este compartimento y el que su ausencia provoque una falta casi absoluta de β -1,6-glucano insoluble en álcali. Recientemente se ha sugerido que Kre5p actúe como una glucosil transferasa que glicosile en el retículo endoplásmico el residuo GPI de las proteínas de la pared celular (Shahinian *et al.* 1998), o que actúe indirectamente en la biosíntesis del β -1,6-glucano a través del plegamiento de proteínas y la secreción de las mismas (Shahinian and Bussey 2000). El papel de las glucosidasas Cwh41p y Rot2p en la

síntesis de este polímero se limitaría al procesamiento de las tres unidades de glucosa de las cadenas azucaradas unidas a los residuos de asparragina de las proteínas. El defecto observado en el β -1,6-glucano en los mutantes $\Delta cwh41$ y $\Delta rot2$ se debe a la ausencia de eliminación de estas tres glucosas. Estos resultados, junto a las evidencias estructurales previas, sugieren que este polímero puede estar unido a las cadenas N-glicosídicas de las proteínas y que la presencia de los residuos de glucosa puede impedir estéricamente dicha unión, originando el defecto observado (Shahinian and Bussey 2000). En este compartimento celular se sitúa también la proteína Cne1p cuya función está poco esclarecida. Se ha observado que la disrupción de *CNE1* exacerba los defectos en β -1,6-glucano observados en los mutantes $\Delta kre6$, $\Delta cwh41$ y $\Delta rot2$. El polímero inicial formado en el retículo endoplásmico sería completado en el **aparato de Golgi** mediante la extensión de la cadena β -1,6 y la adición de ramificaciones β -1,3. La proteína Kre6p (Roemer and Bussey 1991), situada en el aparato de Golgi, podría ser una proteína reguladora, o sintetizar ella misma el glucano. Una búsqueda en las bases de datos ha permitido identificar otras proteínas con regiones con cierta similitud a *KRE6*. Casi todas las proteínas homólogas encontradas son glucanasas, sugiriendo, por otra parte, que Kre6p podría desempeñar una función de procesamiento en vez de elaboración del β -1,6-glucano. En un hipotético modelo de síntesis de este polímero, existiría una glicosilación transitoria con adición de azúcares en el retículo endoplásmico por acción de Kre5p y eliminación de los mismos en el aparato de Golgi por acción de Kre6p (Shahinian and Bussey 2000). *KRE11* codifica una proteína supuestamente citoplásmica que podría realizar un papel de tránsito en el que moviera componentes de la biosíntesis del β -1,6-glucano a través de la ruta de secreción (Shahinian and Bussey 2000). Ya en la **superficie celular**, Kre1p (Boone *et al.* 1990) posiblemente actúe elongando las cadenas de β -1,6-glucano en las ramificaciones unidas por enlaces β -1,3 y Kre9p (Brown and Bussey 1993) actúe como una proteína de entrecruzamiento, aunque su dependencia de la fuente de carbono y la supresión de su expresión por el componente de transducción de señales Skn7p puede presuponer un papel regulatorio (Shahinian and Bussey 2000). Por su parte, Skn1p (Roemer *et al.* 1993) y Knh1p (Dijkgraaf *et al.* 1996), los homólogos funcionales de Kre6p y Kre9p respectivamente, actuarían en una ruta alternativa minoritaria o en determinadas condiciones de crecimiento de las células.

En *C. albicans* se han descrito los homólogos estructurales de varios de los genes mencionados para *S. cerevisiae* involucrados en la síntesis del β -1,6-glucano. Los homólogos de *KRE6* y *SKN1* en *Candida albicans* manifiestan una expresión diferencial relacionada, en este caso, con la forma levaduriforme e hifal de este microorganismo. Así, *CaKRE6* se expresa principalmente en la fase levaduriforme y *CaSKN1* en la fase hifal, aunque la disrupción de *CaSKN1* no afecta al crecimiento hifal en *C. albicans*. Ni el β -1,3 ni el β -1,6-glucano están afectados en mutantes $\Delta skn1$. No se ha conseguido obtener un mutante nulo en el gen *CaKRE6* lo que hace presuponer la esencialidad del mismo (Mio *et al.* 1997b). El gen *CaKRE1* (Boone *et al.* 1991), probablemente ejerza la misma función que su homólogo en *S. cerevisiae*. La identificación de homólogos funcionales de *KRE9* en *C. albicans* (Lussier *et al.* 1998) y

C. glabrata (Nagahashi *et al.* 1998) refleja que la función que desempeña está muy conservada en hongos y revela su importancia como posible diana antifúngica. Los mutantes nulos de *CaKRE9* crecen muy mal en galactosa y son inviables en glucosa. Además tienen niveles imperceptibles de β -1,6-glucano, mientras que en *S. cerevisiae* conservan un 20 % de este polímero respecto de una cepa silvestre. Tampoco forman hifas en suero, este fenotipo unido a la incapacidad de un mutante Δ *ScKre9* para emitir el *shmoo* propio del apareamiento, hace pensar que *ScKre9p* y *CaKre9p* o la presencia de β -1,6-glucano son fundamentales para el crecimiento polarizado normal de la pared celular, tanto en células levaduriformes como hifales (Lussier *et al.* 1998).

2.3. Quitina.

La quitina es un polímero estructural de la pared celular formado por cadenas de 120-170 residuos de **N-acetilglucosamina** con uniones **β -1,4** (Cid *et al.* 1995). Las cadenas de quitina se localizan principalmente en la zona próxima a la membrana plasmática (Smits *et al.* 1999). Cuantitativamente constituye el 1-2 % del peso seco de la pared celular. La unión de la quitina a los glucanos es la responsable de la insolubilidad de éstos en álcali (Kollár *et al.* 1995).

La quitina se localiza principalmente como un **anillo** en el **cuello entre la célula madre y la célula hija**. Durante la citoquinesis se produce más deposición de este polímero, de una forma centrípeta, en el surco generado por la invaginación de la membrana plasmática, originándose una estructura en forma de disco que se conoce como **septo primario** y que cierra el espacio entre ambas células. Tras la deposición de glucano y manoproteínas a ambos lados del septo primario, se forma el septo secundario. Finalmente, después de la citoquinesis, la mayor parte de la quitina queda en la **cicatriz de gemación** de la célula madre. La quitina, aunque en menor porcentaje, también se distribuye aleatoriamente alrededor de la **pared celular de la célula madre**, formando parte de los complejos β -1,3-glucano-quitina y β -1,6-glucano-quitina que son muy importantes en el mantenimiento de la integridad celular (Kollár *et al.* 1997). Durante el proceso de formación del *shmoo* de dos células haploides de tipo sexual opuesto, o en respuesta a la incubación con las feromonas sexuales correspondientes (factor α o α), también se sintetiza quitina que es depositada en la **porción subapical** de dicho *shmoo*. La **pared celular** de la **ascospora** consta de cuatro capas, la segunda de ellas está constituida por quitosán, un derivado deacetilado de quitina (revisado por Cid *et al.* 1995).

La **actividad quitina sintasa** se localiza en la **membrana plasmática**, donde tiene lugar la síntesis de quitina, aunque también está presente en unas vesículas intracelulares llamadas **quitosomas** que parecen liberar actividad quitina sintasa hacia la membrana. La síntesis de quitina tiene lugar como un proceso transmembranal que sucede de forma vectorial, así, el sustrato se localiza en la parte interna de la membrana plasmática y el producto sale hacia el exterior de la misma donde se localiza (Cabib *et al.* 1983). La actividad quitina sintasa (CS) utiliza UDP-N-acetilglucosamina como donador. Se han descrito tres actividades quitina

sintasa en *S. cerevisiae* que presentan un comportamiento muy diferente respecto a su carácter zimogénico, dependencia de cationes y pH óptimo de actuación (Valdivieso *et al.* 1999).

La **quitina sintasa I** (CSI) constituye el 90 % de la actividad quitina sintasa de la célula detectable *in vitro*. El gen estructural que codifica esta actividad es *CHS1* (Bulawa *et al.* 1986). Chs1p es la enzima encargada de **reparar daños** en la pared al final de la citoquinesis, contrarrestando el efecto hidrolítico de la endoquitinasa (*CTS1*) (Cabib *et al.* 1992). La actividad CSI y la expresión de Chs1p permanecen constantes durante el crecimiento vegetativo en células sincronizadas (Choi *et al.* 1994). Cuando se tratan células de *S. cerevisiae* de tipo sexual a con factor α , se induce transitoriamente la transcripción de *CHS1*; sin embargo, Chs1p no es responsable de la síntesis de quitina durante el apareamiento, aunque podría jugar un papel en este proceso quizás como enzima de reparación durante la lisis de la pared celular, necesaria para la fusión de las dos células que aparean (Valdivieso *et al.* 1999). Chs1p se localiza en parte en la membrana plasmática y en parte en los quitosomas.

La actividad **quitina sintasa II** (CSII) fue identificada en un mutante $\Delta chs1$ y el gen que codifica dicha actividad es *CHS2* (Sburlati and Cabib 1986; Silverman *et al.* 1988). *CHS2* parece estar involucrado en la formación del **septo primario** y quizás en algún paso **final de la citoquinesis**, como se deduce de las características fenotípicas de mutantes $\Delta chs2$ (las células no tienen septo primario, forman agregados, son extremadamente grandes con enormes vacuolas y en algunos casos multinucleadas). El hecho de que CSI y CSII lleven a cabo la misma reacción bioquímica *in vitro*, pero desempeñen diferentes funciones *in vivo*, sugiere que estas enzimas deben estar reguladas estrictamente, tanto temporal como espacialmente. Así, Chs2p está regulada durante el ciclo celular, presentando un máximo de expresión durante la septación. La transcripción de *CHS2* es nula durante el tratamiento con feromonas, la esporulación y la fase estacionaria de las células. Esto permite concluir que CSII solo está presente en células con un crecimiento activo. Chs2p se localiza en el cuello entre las células madre e hija al final de la mitosis y debe estar regulada espacialmente para que sólo sea funcional en esta ubicación.

La **quitina sintasa III** es codificada por el gen *CHS3* (Valdivieso *et al.* 1991). Chs3p sintetiza el **90-95 % de la quitina de la pared celular**. Los niveles de esta proteína son constantes a lo largo del ciclo, sin embargo, la proteína se localiza en los lugares de crecimiento polarizado dependiente del ciclo celular. En primer lugar aparece como un anillo en la superficie celular en el punto de emergencia de la yema y se mantiene en el cuello de la célula hija cuando ésta es aún pequeña, para luego desaparecer. Vuelve a aparecer en el cuello entre la célula madre e hija durante la citoquinesis. También es responsable de la síntesis de quitina en las paredes laterales, que tiene lugar principalmente en los últimos estadios del ciclo celular (Shaw *et al.* 1991), de la síntesis de quitina que se localiza en la base del *shmo* durante el apareamiento (Roncero *et al.* 1988) y de la capa de quitosán de la pared celular de la ascospora. Además, también es la encargada de unir la quitina al extremo no reductor

del β -1,3-glucano mediante un enlace β -1,4 (Kollár *et al.* 1995). La disrupción simultánea de *CHS2* y *CHS3* es letal (Shaw *et al.* 1991).

Existen otros genes implicados en la síntesis de quitina que son considerados como reguladores de la actividad CSIII: *CHS4*, *SHC1*, *CHS5*, *CHS6* y *CHS7*, cuya delección provoca defectos graves de quitina en la pared de las células, y que parecen estar implicados tanto en la localización correcta como en la exportación de Chs3p desde el retículo endoplásmico a la superficie celular.

En el hongo patógeno *C. albicans* se ha descrito que las células en forma hifal poseen un contenido mayor en quitina que la células levaduriformes y que la actividad quitina sintasa es dos veces mayor en el primer caso que en el segundo (Munro *et al.* 1998). Este microorganismo tiene tres genes quitina sintasa: *CaCHS1*, *CaCHS2* y *CaCHS3*. El gen *CaCHS1* (Au-Young and Robbins 1990) que presenta una elevada similitud al gen *CHS2* de *S. cerevisiae*, codifica la proteína CaChs1p que parece ser responsable de la formación del septo primario, tanto en levaduras como en hifas, y de mantener la integridad de la pared celular. Se expresa a niveles bajos tanto en la forma hifal como levaduriforme (Munro *et al.* 1998). Aunque ya se había propuesto como un gen esencial (teniendo en cuenta la imposibilidad de deleccionar los dos alelos), acaba de ser confirmada la esencialidad de esta quitina sintasa utilizando una estrategia genética alternativa (Munro *et al.* 2001). Existe una isoforma de esta enzima, *CaCHS1A* que es capaz de complementar la morfología anormal de un mutante $\Delta chs1$ de *S. cerevisiae* (Sudoh *et al.* 1995). Se puede concluir que *CaCHS1* es la primera quitina sintasa esencial descrita, siendo por ello una diana importante para el desarrollo de nuevos antifúngicos. El gen *CaCHS2*, cuya secuencia presenta una elevada similitud a la del gen *CHS1* de *S. cerevisiae*, codifica una proteína cuya expresión se ve inducida en la transición levadura-micelio (Chen-Wu *et al.* 1992). El mutante $\Delta Cachs2$ tiene un crecimiento semejante al de una cepa silvestre, según unos autores ve reducida su síntesis de quitina en un 40 % en la forma hifal (Gow *et al.* 1994), y según otros el contenido de quitina es similar en ambas formas (Mio *et al.* 1996). La virulencia de este mutante no está disminuida (Mio *et al.* 1996). CaChs2p representa la principal actividad quitina sintasa *in vitro*. El gen *CaCHS3* (Sudoh *et al.* 1993; Gow *et al.* 1994; Mio *et al.* 1996), al igual que *ScCHS3*, está involucrado en la síntesis de la mayoría de la quitina celular (90-95 %). Junto a *CaCHS2*, se expresa preferentemente en fase hifal (Mio *et al.* 1996). Los estudios de virulencia son contradictorios, algunos apuntan a una virulencia menor que la de la cepa parental (Bulawa *et al.* 1995), y otros una virulencia similar a la de la cepa silvestre (Mio *et al.* 1996). También se han aislado los genes *CaCHS4* que codifica la quitina sintasa IV de *C. albicans* (Sudoh *et al.* 1999) y el gen *CaCHS7* que presenta una elevada similitud a *ScCHS7* (Sanz *et al.* 2001).

El uso de oligonucleótidos degenerados correspondientes a las secuencias conservadas de los genes *ScCHS1*, *ScCHS2* y *CaCHS1*, ha permitido mostrar mediante técnicas de PCR que la mayoría de las especies fúngicas tienen varios genes que codifican quitina sintasas (Valdivieso *et al.* 1999).

2.4. Manoproteínas.

Este componente de la pared celular representa el 35-40 % del peso seco de la misma. Se trata de **polipéptidos** de gran tamaño con un elevado contenido en **carbohidratos**, hasta un 95 %. Las manoproteínas pueden ser componentes estructurales de la pared celular, como aglutininas y floculinas; o bien enzimas localizadas en la pared celular o en el espacio periplásmico que llevan a cabo un papel morfogénico o trófico o simplemente son secretadas extracelularmente como la invertasa y la fosfatasa ácida.

Las manoproteínas juegan un papel importante en la **porosidad** de la pared celular y en el caso de los hongos como *C. albicans*, también en aspectos relacionados con la patogenicidad, como la **adhesión** a los tejidos y la **inmunogenicidad** que presentan (Calderone 1993). Son sintetizadas intracelularmente y la unión de las cadenas azucaradas a las proteínas se lleva a cabo mediante N- y O-glicosilación y para algunas proteínas, además, mediante la unión de una molécula de GPI (glicosilfosfatidilinositol) en su extremo C-terminal (Cid *et al.* 1995).

La expresión de numerosas proteínas de la pared celular está regulada por el ciclo celular (Smits *et al.* 1999; Spellman *et al.* 1998) y afectada por la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales (Chu *et al.* 1998).

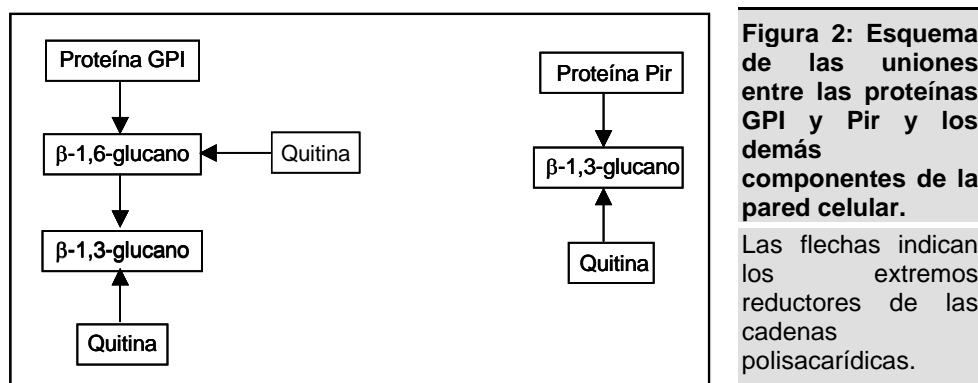
Las manoproteínas pueden ser extraídas de la pared celular mediante diferentes métodos, con arreglo a los cuales han sido clasificadas.

2.4.1. Proteínas unidas no covalentemente o unidas mediante puentes disulfuro a la pared celular.

Estas proteínas se pueden extraer de la pared celular con SDS y agentes reductores como el mercaptoetanol o el ditioneitol (Cappellaro *et al.* 1998; Morsa *et al.* 1997); sin embargo, gran parte de las mismas proceden en realidad de la membrana plasmática y no de la pared. Por eso, en un primer estudio, se marcaron las proteínas extracelulares con un reactivo no permeable y posteriormente se extrajeron a partir de paredes celulares aisladas, con el detergente SDS y en condiciones no reductoras (Morsa *et al.* 1997). En un estudio posterior la extracción se llevó a cabo con ditioneitol a partir de células intactas (Cappellaro *et al.* 1998). Las proteínas obtenidas, que probablemente sean las mismas en ambos estudios, fueron identificadas. Algunas de ellas corresponden a proteínas conocidas: una exoglucanasa (Exg1p), una endoglucanasa (Bgl2p) y una quitinasa (Cts1p), otras tres proteínas presentaban homología con las glucanasas y otra de ellas estaba relacionada con la familia Pir.

2.4.2. Proteínas unidas covalentemente a la pared celular.

Este tipo de proteínas pueden ser liberadas de la pared celular mediante el tratamiento con β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas o quitinasas, lo que indica que están unidas de forma covalente a los glucanos de la pared. El heteropolímero β -1,6/ β -1,3-glucano o el β -1,3-glucano son los responsables del anclaje de estas manoproteínas a la pared celular. Se pueden distinguir dos tipos de manoproteínas unidas de forma covalente a la pared en función del tipo de unión: proteínas GPI y proteínas Pir (Figura 2). La transcripción de más del 50 % de los genes que codifican estas proteínas dependen del ciclo celular (Spellman *et al.* 1998).



A) Proteínas GPI.

Estas proteínas están unidas covalentemente al β -1,6-glucano y pueden ser extraídas de la pared celular mediante digestión con β -1,6 o β -1,3-glucanasas (Kapteyn *et al.* 1999a; Orlean 1997). Mediante análisis informático se han identificado en el genoma de *S. cerevisiae* del orden de 50 genes que codifican proteínas de este tipo (Caro *et al.* 1997; Hamada *et al.* 1998). Estas manoproteínas tienen tres características comunes: una secuencia señal en el extremo N-terminal, una región rica en serinas y treoninas y una señal de anclaje a la molécula GPI en el extremo C-terminal. Esta señal consta de un dominio hidrofóbico con un tamaño mínimo de 12 aminoácidos separados del sitio de unión de la molécula GPI (aminoácido ω) por un tramo corto de aminoácidos más polares. En *S. cerevisiae* las proteínas GPI no están únicamente presentes en la membrana plasmática sino que también aparecen unidas covalentemente a la pared celular (Kapteyn *et al.* 1999a). En este último caso las proteínas no contienen la molécula GPI entera sino lo que se ha denominado "GPI-

remanente”, que es el resultado del procesamiento de la molécula GPI liberada de la membrana plasmática y unida al β -1,6-glucano. Los autores han propuesto un motivo dibásico, localizado hacia el extremo 5' del sitio ω de unión a GPI, como responsable de la localización de estas proteínas en la membrana plasmática, mientras que las proteínas que carecen de este motivo se dirigirían a la pared celular. Algunas de estas manoproteínas han sido identificadas y varias están involucradas en fenómenos relacionados con la superficie celular (Kapteyn *et al.* 1999a).

Un 2 % de este tipo de proteínas es resistente a la extracción con β -1,3-glucanasas y se liberan tras tratamiento con exoquitinasa, se trata de una fracción minoritaria de proteínas GPI que están unidas a la quitina a través, únicamente, del β -1,6-glucano (Kapteyn *et al.* 1997).

B) Proteínas Pir.

Estas proteínas pueden ser extraídas de la pared mediante digestión con β -1,3-glucanasas o mediante un tratamiento suave con álcali. Están muy O-glicosiladas. El hecho de que puedan ser liberadas de la pared mediante la incubación con un álcali débil, un tratamiento que conduce a la eliminación de la O-glicosilación en un proceso denominado beta-eliminación, podría indicar que la unión de las proteínas Pir a la pared celular se produce a través de sus cadenas de O-glicosilación (Mrsa *et al.* 1997).

Las proteínas de esta familia comparten varias características: un péptido señal en el extremo N-terminal, un punto de reconocimiento de la proteasa Kex2p tras los primeros 60-70 aminoácidos del extremo aminoterminal y varias repeticiones internas en su secuencia (de lo cual deriva su nombre, *Proteins with Internal Repeats*).

2.5. Modelo modular de organización de la pared celular.

Todos los componentes descritos de la pared celular se unen para formar complejos macromoleculares, que a su vez son ensamblados dando lugar a la estructura de la pared. Los mecanismos precisos de ensamblaje permanecen aún desconocidos, aunque se ha propuesto un modelo modular de organización de la pared celular (Kollár *et al.* 1997; Lipke and Ovalle 1998; Smits *et al.* 1999). Según este modelo, las fibras insolubles de β -1,3-glucano se distribuyen alrededor de la superficie de la célula, uniéndose mediante un enlace covalente a las cadenas de quitina y conformando así la parte interna de la pared celular. Hacia el exterior de la pared se sitúan las manoproteínas unidas al extremo no reductor de las moléculas de β -1,3-glucano, bien directamente, como es el caso de las proteínas Pir, bien indirectamente a través de una molécula de β -1,6-glucano en el caso de las proteínas GPI. También están presentes en la pared proteínas unidas a quitina mediante cadenas cortas de β -1,6-glucano, aunque en menor proporción. Por tanto, se puede hablar de dos grandes módulos o bloques, el bloque GPI (quitina→ β -1,3-glucano→ β -1,6-glucano→Proteína-GPI) y el bloque Pir

(quitina→ β -1,3-glucano→Proteína-Pir), que constituirían las unidades estructurales de la pared celular (Kapteyn *et al.* 1999a) (Figura 3).

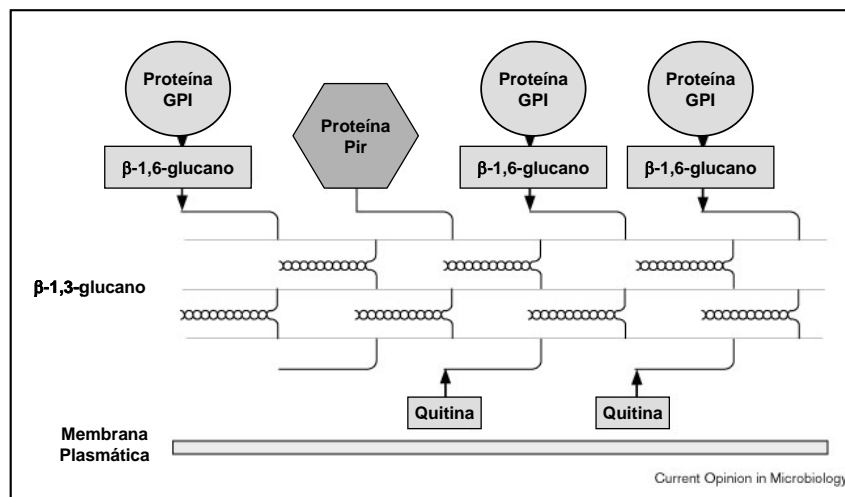


Figura 3: Modelo modular de la pared celular de *S. cerevisiae*.

Reproducido de Smits *et al.* 1999.

Una pregunta interesante es si este modelo modular de organización de la pared celular descrito para *S. cerevisiae* también se presenta en otros hongos como por ejemplo en *C. albicans*. Existen evidencias claras de la presencia de una familia de proteínas GPI en *C. albicans*, la familia Als (Hoyer *et al.* 1998a; Hoyer *et al.* 1998b) y se han descrito uniones al β -1,6-glucano (Kapteyn *et al.* 2000). Además, mediante análisis informático se han encontrado aproximadamente 80 ORFs que codificarían proteínas de este tipo, y que están siendo analizadas (de Groot *et al.* 2001). Estos datos, junto con otros anteriores (Kapteyn *et al.* 1995), apuntan hacia la existencia del módulo β -1,3-glucano→ β -1,6-glucano→ Proteína-GPI de forma similar a *S. cerevisiae*. Además, la pared celular de *C. albicans* contiene varias proteínas que, como en el caso de *S. cerevisiae*, pueden ser liberadas al medio mediante tratamiento con álcali suave (Mormeneo *et al.* 1994). Muy recientemente y de forma simultánea, dos grupos han demostrado inmunológicamente la existencia de al menos dos proteínas Pir en *C. albicans* (Kandasamy *et al.* 2000; Kapteyn *et al.* 2000) unidas al β -1,3-glucano mediante un enlace sensible al tratamiento con álcali suave y resistente al tratamiento con β -1,6-glucanasa. Estos datos apoyan la existencia en *C. albicans* de un módulo similar β -1,3-glucano→ Proteína-Pir. Sin embargo, existe una diferencia

significativa entre estos dos microorganismos respecto a la estructura de la pared celular. La cantidad de proteínas de este tipo resistentes al tratamiento con β -1,3-glucanasa en *C. albicans* es aproximadamente cuatro veces mayor que en *S. cerevisiae*. Puesto que ambas levaduras tienen los mismos niveles de quitina, este hecho sugeriría la existencia de un mayor número de uniones entre quitina y β -1,6-glucano en *C. albicans* que en *S. cerevisiae* (Kapteyn *et al.* 2000).

2.6. Ensamblaje de los componentes de la pared celular.

Según el modelo modular descrito, los diferentes polisacáridos y manoproteínas se interconectan en la **parte externa de la membrana plasmática** mediante diferentes uniones glicosídicas para formar los “**bloques de construcción**”, que a su vez, también están interconectados para constituir una pared celular madura. Estos pasos finales de la síntesis de la pared fúngica requieren la actuación de **enzimas** específicas encargadas de dicha interconexión, enzimas que deben localizarse en la membrana plasmática o en la pared propiamente dicha (Molina *et al.* 2000). Hasta la fecha, las enzimas caracterizadas con esta función son en *S. cerevisiae*: Bgl2p (Goldman *et al.* 1995), Gas1p (Popolo and Vai 1999), Crh1p y Crh2p (Rodríguez-Peña *et al.* 2000). Se han descrito proteínas homólogas a estas enzimas en otros hongos: Bgl2p (Hartland *et al.* 1991), Phr1p y Phr2p (Fonzi 1999) en *C. albicans*; Epd1p (Nakazawa *et al.* 1998) en *C. maltosa*; y Bgl2p (Mouyna *et al.* 1998) y Gel1p (Mouyna *et al.* 2000a) en *A. fumigatus*. En las bases de datos se han encontrado las secuencias de Epd2p de *C. maltosa* y los genes 013692 y P78785 de *S. pombe* de elevada homología a Gel1p, aunque todavía se desconoce su función (Mouyna *et al.* 2000b). Los genes Gas1p, Gas2p y Gasp3 de *C. glabrata*, con una elevada homología a Gas1p de *S. cerevisiae*, parecen estar relacionados con la biosíntesis de la pared celular, pero todavía se desconoce la función precisa que realizan (Weig *et al.* 2001).

Las proteínas Bgl2p de *S. cerevisiae* y *C. albicans* han sido caracterizadas bioquímicamente como **glicosiltransferasas** que catalizan, en primer lugar, la hidrólisis de un disacárido de una molécula de β -1,3-glucano y, posteriormente, la transferencia del mismo al extremo no reductor de una nueva cadena de este polímero. La unión entre el disacárido y la nueva cadena de β -1,3-glucano se realiza mediante un enlace β -1,6 (Goldman *et al.* 1995; Hartland *et al.* 1991).

Recientemente ha sido demostrada una actividad **β -1,3-glucanosiltransferasa** en Gas1p (Popolo and Vai 1999), Gel1p, Phr1p y Phr2p (Mouyna *et al.* 2000a). Estas proteínas GPI se localizan en la cara externa de la membrana plasmática y catalizan la hidrólisis y posterior transferencia de una cadena de β -1,3-glucano al extremo reductor de otra cadena similar. La generación de un nuevo enlace β -1,3 entre la molécula donadora y la aceptora tiene como resultado la elongación del β -1,3-glucano. Estos datos, junto con estudios previos en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Fonzi 1999) sugieren el siguiente orden cronológico de los eventos que tienen lugar en la síntesis y las modificaciones posteriores de las moléculas de β -1,3-glucano en la pared celular: a)

biosíntesis de moléculas lineales de β -1,3-glucano, b) ramificaciones del β -1,3-glucano mediante uniones β -1,6, c) elongación de las cadenas laterales del β -1,3-glucano y d) entrecruzamiento de otros polímeros (quitina, β -1,6-glucano, proteínas y/o galactomananos) en el extremo no reductor de las cadenas laterales del β -1,6-glucano (Figura 4).

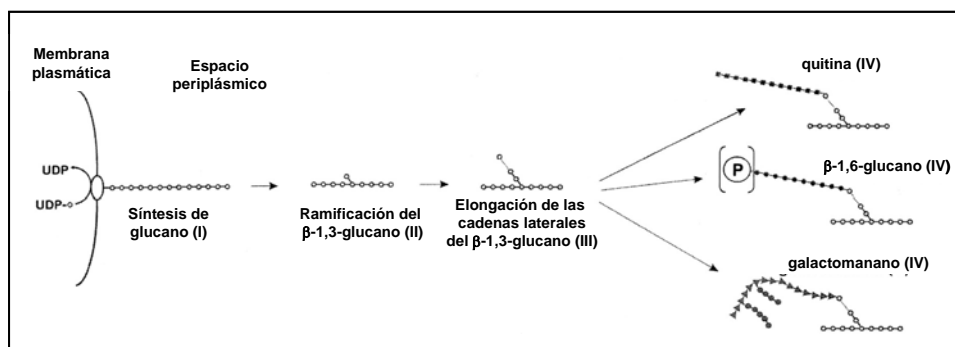


Figura 4: Orden cronológico de la síntesis del β -1,3-glucano y posterior entrecruzamiento con los otros polímeros de la pared celular.

Reproducido de Mouyna *et al.* 2000a.

En *C. albicans* la β -1,3-exoglucanasa mayoritaria, Xog1p (Chambers *et al.* 1993a), cataliza *in vitro* una eficaz reacción de transglucosilación que puede ser 10 veces más rápida que la reacción de hidrólisis con elevadas concentraciones de oligosacáridos como sustrato, y que conduce a la formación de nuevos enlaces β -1,3 (Stubbs *et al.* 1999). Aunque esta enzima está implicada en el metabolismo de la pared celular, su papel fisiológico aún permanece desconocido (ver epígrafe de exo- β -glucanasas).

2.7. Mecanismo compensatorio.

La pared celular fúngica es esencial para el mantenimiento de la integridad celular y por eso las células poseen mecanismos destinados a preservar esta estructura. La mayoría de los genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de los componentes de la pared celular son redundantes, es decir, existen varias proteínas que pueden ejercer aparentemente la misma función y sustituir así la falta de alguna de ellas en un determinado momento (Orlean 1997).

Los mutantes defectuosos en la síntesis de alguno de los componentes de la pared celular o en enzimas que intervienen en la elongación de los β -glucanos presentan unas alteraciones características en la composición y arquitectura de la

pared que parecen compensar la pérdida de resistencia causada por la mutación. Estas alteraciones consisten en: a) la **reducción de la concentración de β -1,3-glucano y β -1,6-glucano** de la fracción álcali insoluble, lo que provoca un aumento de la relación glucano álcali soluble/ álcali insoluble, b) la **secreción al medio de cultivo de β -glucano y glicoproteínas** que normalmente se encuentran unidas al glucano de la pared celular, c) el **aumento de la cantidad de quitina y de manoproteínas** unidas a la misma a través del β -1,6-glucano y d) la **inducción de la expresión de la subunidad Fks2p** de la β -1,3-glucano sintasa (Popolo *et al.* 1997; Kapteyn *et al.* 1999b; Smits *et al.* 1999; Mouyna *et al.* 2000a; Fonzi 1999; Valdivieso *et al.* 2000).

Este mecanismo compensatorio fue descrito por primera vez por Popolo y colaboradores (Popolo *et al.* 1997), que observaron un incremento en la cantidad de quitina en la pared de mutantes $\Delta gas1$, los cuales presentan niveles muy disminuidos de β -1,6-glucano y algo reducidos de β -1,3-glucano. Otros fenómenos compensatorios que se manifiestan en este mutante son una liberación de β -1,3-glucano y de proteínas glucosiladas al medio de cultivo y un aumento en el porcentaje de manoproteínas unidas a quitina a través del β -1,6-glucano (del 2 % en células silvestres al 40 % en mutantes $\Delta gas1$) (Kapteyn *et al.* 1997). El incremento de quitina y la reducción en el nivel de β -1,6-glucano se ha descrito también en otros mutantes de la misma familia de glucanosiltransferasas como $\Delta phr1$ de *C. albicans* y $\Delta epd1$ de *C. maltosa*. Sin embargo, el aumento de la relación glucano álcali soluble/ álcali insoluble se observa solo en $\Delta phr1$ y no aparece en $\Delta epd1$ (Popolo and Vai 1998; Nakazawa *et al.* 1998).

Estos fenotipos no son específicos de mutaciones en esta familia de genes. El incremento en el contenido de quitina se ha observado también en los mutantes $\Delta mnn9$ (defectuosos en la N-glicosilación de las proteínas) y $\Delta pmt1$ (defectuosos en la O-glicosilación de las proteínas) tanto de *S. cerevisiae* (Kapteyn *et al.* 1999a) como de *C. albicans* (Kapteyn *et al.* 2000). En este tipo de mutantes en *C. albicans* existe además un aumento de la cantidad de proteínas GPI resistentes al tratamiento con β -1,3-glucanasa, (del 9 % en una cepa silvestre al 21-33 % en estos mutantes) y por tanto, unidas a quitina directamente a través del β -1,6-glucano (Kapteyn *et al.* 2000).

Junto al aumento de quitina, existe un aumento del entrecruzamiento de la misma con proteínas β -1,6-glicosiladas en mutantes $\Delta fks1$, que carecen de la β -1,3-glucano sintasa y en mutantes $\Delta knr4$, también afectados en la síntesis del β -1,3-glucano. En los mutantes delecionados en los genes *GAS1* y *FKS1* se ha observado un incremento en la expresión de Cwp1p y de Fks2p, la subunidad alternativa de la β -1,3-glucano sintasa, que podría igualmente formar parte de reacciones compensatorias encaminadas a mantener la integridad celular (Kapteyn *et al.* 1997; Popolo *et al.* 1997; Ram *et al.* 1998). Por otra parte en algunos de los mutantes Δkre que presentan niveles disminuidos de β -1,6-glucano y que liberan gran cantidad de proteínas GPI al medio de cultivo, se ha observado un incremento en los niveles de proteínas Pir ancladas a la pared celular a través del β -1,3-glucano, así como un incremento en los niveles de β -1,3-glucano y un aumento en la transcripción de *FKS2* (Kapteyn *et al.* 1999b). En *C. albicans*, el mutante hemizigótico $\Delta kre6$, que

presenta una reducción del 80 % en el nivel del β -1,6-glucano, también secreta gran cantidad de proteínas Alsps al medio de cultivo; sin embargo, el nivel de quitina permanece constante, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* donde una mutación similar en una cepa haploide conduce a un incremento del contenido de este polímero (Kapteyn *et al.* 2000) . Todos estos fenómenos parecen formar parte de uno - o varios- mecanismos compensatorios que se activan en condiciones de daño o debilitamiento de la pared celular.

3. Regulación y mantenimiento de la integridad celular.

Como ya se ha comentado anteriormente en esta memoria, debido a la gran importancia de la pared celular, un debilitamiento de la misma conlleva la activación de mecanismos de recuperación que conducen a cambios compensatorios en la pared. En *S. cerevisiae* están descritas tres rutas de MAP kinasas (por *Mitogen-activated protein*) que parecen estar involucradas en el mantenimiento de la integridad de la pared: una de ellas es conocida como ruta de integridad celular o ruta PKC, la segunda actuaría paralelamente a la ruta PKC y se conoce como ruta SVG y la tercera es la ruta de respuesta a choque osmótico o ruta HOG.

A) Ruta PKC o de integridad celular.

La ruta PKC responde a diversos estímulos como son la elevada temperatura de crecimiento, hipoosmolaridad externa, compuestos que alteran la pared celular, feromonas y limitación de nutrientes. Esta ruta de integridad celular incluye los siguientes elementos: Rho1p, una proteína de unión a GTP; Pkc1p, la proteína quinasa C; Bck1p, la MAPKKK; Mkk1p y Mkk2p, las MAPKK redundantes; Slt2p, la MAPK y los factores de transcripción diana Rlm1p y SBF, este último que comprende a Swi4p y Swi6p (Heinisch *et al.* 1999). Se ha propuesto un esquema de funcionamiento de dicha ruta (figura 5) según el cual el debilitamiento de la pared celular induciría una distensión de la membrana plasmática y la transmisión de las perturbaciones sufridas en la pared ocurriría a través de las familias de proteínas de membrana Wsc y Mid. Esta señal se enviaría a Rho1p a través de Tor2p, una fosfatidilinositol-4-kinasa y del factor de intercambio GDP/GTP Rom2p. Rho1p no sólo modula la ruta PKC sino también la actividad β -1,3-glucano sintasa, conduciendo todo ello a un incremento en la síntesis de quitina y glucano, una alteración en el entrecruzamiento de glucano y proteínas y un aumento de la expresión de Cwp1 y de proteínas Pir (Smits *et al.* 1999).

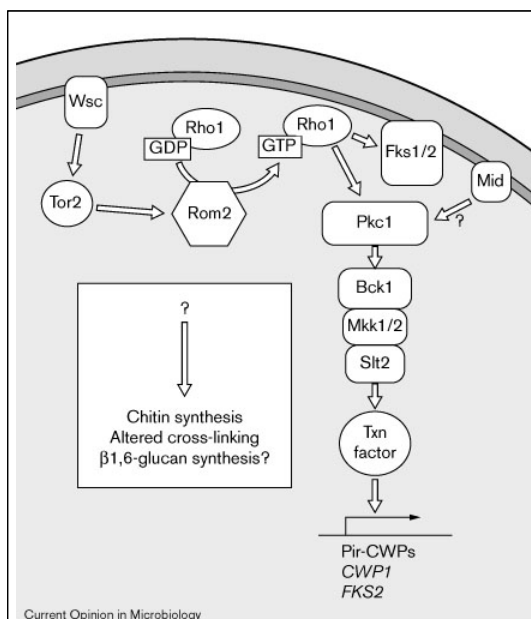


Figura 5: Modelo propuesto para la ruta de integridad celular.

Reproducido de Smits *et al.* 1999.

La disrupción de los genes *PKC1*, *BCK1*, *MKK1/MKK2* y *SLT2*, o mutaciones en los mismos, originan un fenotipo de letalidad termosensible debido a la lisis de las células en crecimiento cuando se incrementa la temperatura. Esta lisis puede remediarse mediante la estabilización osmótica del medio. Un mutante $\Delta pkc1$ creciendo en un medio con soporte osmótico presenta una reducción del 30-70 % en el contenido total de β -glucano, así como una ligera reducción en el contenido de manano. Estos defectos en la síntesis de polisacáridos que pueden afectar al correcto entrecruzamiento de los diferentes componentes de la pared celular, apoyan la hipótesis de que se requiere la funcionalidad de estos genes para la generación de una pared celular estable (Orlean 1997).

Otros datos que unen la ruta de integridad celular con la síntesis de la pared son las interacciones genéticas entre algunos genes involucrados en la síntesis del β -1,6-glucano y los involucrados en esta cascada de MAP kinasas. Así, los defectos de $\Delta pkc1$ son suprimidos por *SKN7* y *KRE6*. Existe letalidad sintética en mutantes dobles $\Delta pkc1 \Delta kre6$, $\Delta pkc1 \Delta skn1$, $\Delta pkc1 \Delta kre11$ y $\Delta pkc1 \Delta kre2$, también en mutantes $\Delta slit2 \Delta kre6$ y en los triples mutantes $\Delta mkk1 \Delta mkk2 \Delta kre6$ y $\Delta mkk1 \Delta mkk2 \Delta kre11$ (Cid *et al.* 1995). Por otra parte, dobles mutantes $\Delta fks1 \Delta pkc1$ y $\Delta gas1 \Delta pkc1$ también son sintéticos letales (Garrett-Engle *et al.* 1995; Popolo *et al.* 1997); $\Delta slit2$ presenta letalidad sintética con $\Delta fks1$ (Garrett-Engle *et al.* 1995) y con $\Delta och1$ (Lee and Elion 1999) y el doble mutante $\Delta slit2 \Delta mnn2$ muestra un crecimiento muy lento (Rayner and Munro 1998). Otros estudios muestran que Bgl2p, que codifica una endo- β -1,3-glucanasa y glicosiltransferasa, es parcialmente responsable de los

defectos morfogénicos observados en mutantes $\Delta pkc1$, ya que un mutante $\Delta bgl2$ suprime parcialmente el defecto en crecimiento de $\Delta pkc1$ (Shimizu *et al.* 1994).

Se han identificado varios genes cuya expresión depende de Slt2p y que codifican enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular: *FKS1* y *FKS2*, las subunidades catalíticas de la β -1,3-glucano sintasa, *MNN1* que codifica una α -1,3-manosiltransferasa; *GAS1* que codifica una β -1,3-glucanosiltransferasa; *KRE6* que está implicado en la síntesis del β -1,6-glucano y *CHS3* que codifica una quitina sintasa (Igual *et al.* 1996; Zhao *et al.* 1998). La reciente identificación por Jung y Levin de al menos 18 genes relacionados con la pared celular que están controlados por la ruta PKC mediante el factor de transcripción Rlm1p, confirma la naturaleza dinámica de la pared celular y la importancia de esta ruta en el mantenimiento de la integridad de la misma (Jung and Levin 1999).

B) Ruta SVG.

Recientemente se ha propuesto que una segunda cascada de transducción de señales, a la que se ha denominado ruta SVG (por *STE-Vegetative Growth*) podría funcionar, en parte, en el mantenimiento de la integridad celular de forma paralela a la ruta PKC (Lee and Elion 1999). Dicha ruta está constituida por las proteínas Ste20p, Ste11p, Ste7p, Kss1p y Ste12p (figura 6), y regula la expresión, entre otros genes, de *FKS2*.

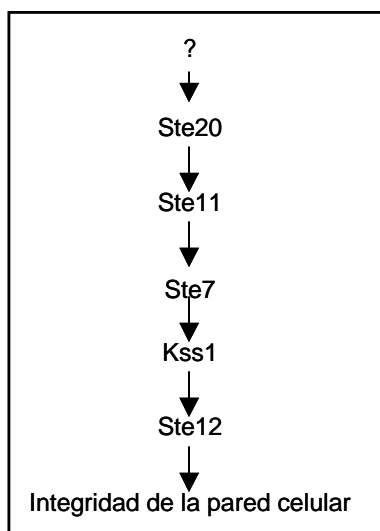


Figura 6: Modelo propuesto para la ruta SVG de mantenimiento de la integridad de la pared celular.

C) Ruta HOG o de respuesta a alta osmolaridad.

El metabolismo de la pared celular también está influenciado por la cascada de MAP kinasas HOG (*High Osmolarity Glycerol response*) o ruta de respuesta a alta

osmolaridad. El aumento de osmolaridad externa es detectado, al menos, por dos osmosensores, Sln1p y Sho1p, que median la activación de Pbs2p (MAPKK) y Hog1p (MAPK) (Figura 7) (Maeda *et al.* 1995), aunque el papel del Sho1 como osmosensor se ha puesto en entredicho y parece realmente constituir un estructura adaptadora en la transmisión de la señal (Posas and Saito 1997; Reiser *et al.* 1999). También existen evidencias de la participación de esta cascada en la degradación del β -glucano. El gen *PBS2* en multicopia o la delección del gen *PTC1*, una fosfatasa cuyo producto regularía negativamente dicha ruta, confieren resistencia a la toxina *killer* K1 de una cepa sensible a la misma; en estas condiciones, tanto los niveles de mRNA de *EXG1* como la actividad correspondiente son mayores. Por esta razón, parece ser que el fenotipo de resistencia a la toxina *killer* es debido a un incremento en la actividad de la proteína codificada por *EXG1*, hecho que sugiere que este gen es uno de los responsables de la reestructuración del β -1,6-glucano, polímero al que parece unirse la toxina *killer* de *S. cerevisiae* (Jiang *et al.* 1995). Por el contrario, la delección del gen *PBS2* provoca un descenso de los niveles de mRNA de *EXG1* y de la actividad correspondiente y, consecuentemente, un ligero aumento en el nivel de β -1,6-glucano y un fenotipo de hipersensibilidad a la toxina *killer*. El hecho de que en cepas que llevan el alelo nulo del gen *EXG1* se suprima sólo parcialmente el fenotipo de resistencia a la toxina *killer* observado por sobreexpresión de *PBS2* o interrupción de *PTC1* en estirpes silvestres para *EXG1*, sugiere que deben existir otros genes implicados en la dinámica de la pared celular que estarán, de alguna forma, regulados por la ruta Pbs2p-Hog1p. Estos genes podrían ser, por ejemplo, otras glucanasas o genes necesarios para la biosíntesis del β -glucano.

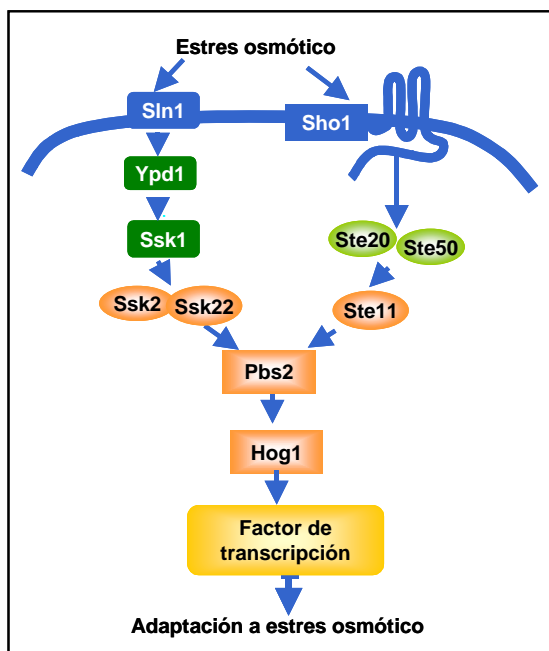


Figura 7: Ruta de respuesta a choque osmótico o ruta HOG.

II. ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE LA PARED CELULAR: GLICOSIDASAS.

La pared celular fúngica es una estructura muy dinámica, siendo necesaria la existencia de un equilibrio entre las rutas de síntesis y de degradación para que se mantenga la viabilidad y sea posible realizar los diferentes procesos morfogénicos. Aunque los mecanismos implicados en dichos procesos no han sido determinados en su totalidad, parece claro que la incorporación de nuevo material requiere fenómenos que degraden la pared previamente sintetizada mediante las denominadas enzimas líticas, hidrolasas con especificidad sobre alguno de los enlaces β -glicosídicos de los componentes de la pared celular. Todas las glicosidasas estudiadas hasta el momento son glicoproteínas que se secretan hacia el exterior y se localizan en el espacio periplásmico o quedan asociadas a la pared celular (Cid *et al.* 1995).

Quitinasas.

La quitina, como ya ha sido descrito, es un componente minoritario de la pared celular que se deposita específica y mayoritariamente en la región del septo y que es importante para la estabilidad mecánica de esta unión temporal entre la célula madre y la célula hija. La degradación de este septo es fundamental para permitir que la célula hija comience una vida independiente. Hasta el momento, se ha detectado una única endoquitinasa en *S. cerevisiae*, que es una enzima periplásmica cuya actividad es mayoritariamente secretada al medio cuando las células crecen en un medio rico en nutrientes como YPD (Elango *et al.* 1982). El gen responsable de esta actividad es *CTS1* (Kuranda and Robbins 1987; Kuranda and Robbins 1991). El pequeño porcentaje de actividad endoquitinasa que queda asociado a la pared celular parece ser el responsable de la degradación del septo durante la citoquinesis, ya que la disrupción de *CTS1* impide que las células se separen, originándose grandes agregados celulares. Estudios realizados con células sincronizadas muestran que la expresión de *CTS1* es periódica y que la transcripción del gen está regulada por Ace2p, un factor de transcripción con dedo de zinc. Mutantes *ace2* muestran un defecto en la separación celular (ver Cid *et al.* 1995; Orlean 1997).

En *C. albicans* se han clonado tres genes que codifican para proteínas con actividad quitinasa, *CaCHT1*, *CaCHT2* y *CaCHT3* (McCreath *et al.* 1995; McCreath *et al.* 1996). Los tres genes presentan una notoria similitud con otros genes de quitinasas descritos. La transcripción de *CaCHT2* y *CaCHT3* es mayor cuando *C. albicans* se encuentra en fase de levadura que en fase micelial. No ha podido detectarse el transcrito de *CaCHT1* en ninguna de las fases citadas. Posteriormente se observó que CaCh1p carece de la región rica en serina y treonina característica de las otras quitinasas de *C. albicans* (McCreath *et al.* 1996). Muy recientemente se han delecionado los genes *CaCHT2* y *CaCHT3* y se ha sobreexpresado *CaCHT2* para

estudiar el papel de estas enzimas en los procesos morfogénicos (Pallotti *et al.* 2000).

Mananasas.

La información disponible respecto de un sistema responsable de la hidrólisis de los polímeros integrantes de la pared celular que contienen manosa es muy limitada. Varios investigadores han llevado a cabo una purificación parcial de una α -manosidasa no específica en *S. cerevisiae*, que es activa frente al sustrato p-nitrofenil- α -manopiranosido. Esta actividad se ha descrito como un componente de la membrana vacuolar. El gen estructural de esta actividad es *AMS1* (Kuranda and Robbins 1987). Los mutantes Δ *ams1* presentan un crecimiento vegetativo y una capacidad de esporulación semejantes a una cepa silvestre. Experimentos realizados con cepas silvestres haploides *AMS1*, cepas Δ *ams1* y con manosa tritiada sugieren que la α -manosidasa podría jugar un papel importante en el metabolismo de las glicoproteínas, catalizando la hidrólisis secuencial de residuos de manosa del extremo no reductor de las cadenas de manano (revisado por Cid *et al.* 1995).

Glucanasas.

Como se mencionó anteriormente, el β -glucano constituye el principal polisacárido responsable del mantenimiento de la forma y de la rigidez de la pared celular de las levaduras. Aunque los glucanos de la pared no presentan un recambio apreciable durante el crecimiento de estos microorganismos, probablemente exista una hidrólisis dirigida, limitada y finamente regulada de estos polímeros por β -glucanasas endógenas durante ciertos procesos morfogénicos como la gemación, el crecimiento de la pared, la conjugación, la esporulación y la transición morfológica.

Las β -glucanasas han sido estudiadas en numerosas levaduras. Según su modo de acción sobre el polímero, exo o endohidrolítico, se pueden clasificar como **exoglucanasas** o **endoglucanasas**. Las primeras actúan sobre los enlaces β -O-glicosídicos terminales del extremo no reductor de la molécula de sustrato, originando glucosa como producto final único de la hidrólisis del polímero; las endoglucanasas, por su parte, hidrolizan los enlaces internos de la cadena de β -glucano liberando una mezcla de oligosacáridos (Figura 8). Respecto a la especificidad, la mayoría de las exoglucanasas son capaces de hidrolizar tanto enlaces β -1,3 como enlaces β -1,6, aunque estos últimos con menor eficiencia. La actividad **exo- β -1,3-glucanasa** se pone de manifiesto al ser analizada mediante la utilización de sustratos como laminarina (sustrato lineal de β -1,3-glucano), MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido) y el derivado sintético pNPG (paranitrofenil- β -D-glucopiranosido) (Cenamor *et al.* 1988; Farkas *et al.* 1973). La actividad **exo- β -1,6-glucanasa** se puede evidenciar empleando pustulán, un sustrato lineal de β -1,6-glucano (Cenamor *et al.* 1988). Las endoglucanasas, por el contrario,

exhiben una marcada especificidad en cuanto al enlace a hidrolizar, conociéndose tanto β -1,3 como β -1,6-**endoglucanasas**; la actividad endohidrolítica se puede poner de manifiesto mediante la utilización de laminarina oxidada (Cenamor *et al.* 1988).

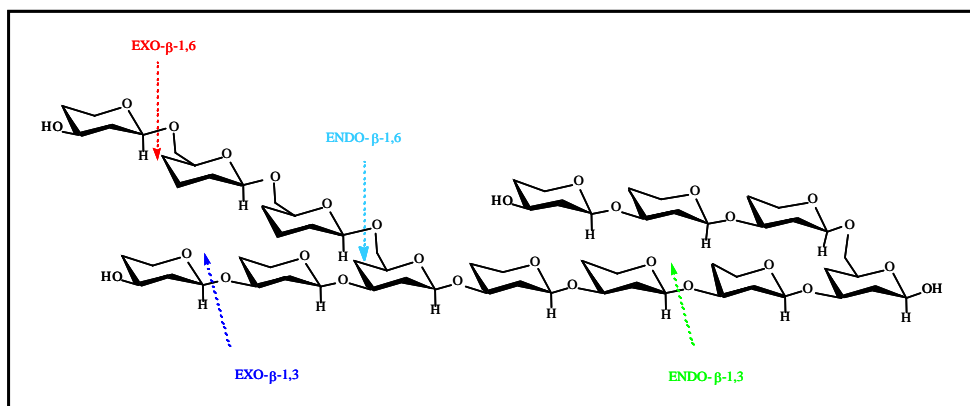


Figura 8: Actividad exo y endo hidrolítica de las glucanasas.

El potencial hidrolítico mejor estudiado corresponde a *S. cerevisiae*, que presenta varias formas bien caracterizadas con actividad glucanásica en las distintas fases de su ciclo biológico (revisado por Cid *et al.* 1995; Orlean 1997). Durante el ciclo vegetativo de esta levadura se detectan tres glicoproteínas con capacidad para hidrolizar β -glucanos,. Dos de ellas presentan actividad exo-hidrolítica (Farkas *et al.* 1973) y han sido denominadas minoritaria o Exgla y mayoritaria o Exglb por su abundancia relativa. Poseen la misma fracción polipeptídica, distinguiéndose por su contenido en carbohidratos que representa el 11-14 % de peso seco en la forma más abundante (Exglb) y alrededor del 40 % en la forma minoritaria (Exgla) (Nebreda *et al.* 1987; Ramirez *et al.* 1989). La tercera β -glucanasa detectable en el medio de cultivo presenta actividad endohidrolítica únicamente frente a enlaces β -1,3 (Farkas *et al.* 1973). Usando mutantes que carecen de las exoglucanasas mencionadas (Exgla y Exglb), se identificaron dos enzimas capaces de hidrolizar glucano que eran detectadas sólo en lisados de protoplastos pero no en extractos celulares y en sobrenadantes de cultivo. Ambas poseen carácter exohidrolítico (Cenamor *et al.* 1987). La esporulación, por su parte, comporta un drástico aumento en la actividad β -1,3-glucanásica presente en extractos celulares. Este incremento es debido mayoritariamente a la inducción de una nueva forma enzimática con actividad exo- β -1,3-glucanásica, (del Rey *et al.* 1979; del Rey *et al.* 1980; San Segundo *et al.* 1993).

A) Exo- β -glucanasas.

En los últimos años se ha realizado mucho trabajo para intentar caracterizar el sistema genético que gobierna la síntesis del β -1,3-glucano en levaduras. Una aproximación genética fue la obtención de mutantes con una actividad exo- β -glucanasa reducida, seleccionados mediante un método rápido y sensible que aprovecha dos características de estas enzimas: la localización periplásmica, lo que permite ensayar su actividad utilizando células enteras y su capacidad para actuar frente a aril-glucósidos, concretamente frente al derivado fluorogénico 4-metil-umbeliferil- β -D-glucopiranosido (MUG), cuya hidrólisis libera metilumbeliferona, compuesto que puede ser detectado por la fluorescencia emitida tras excitación con luz ultravioleta (Santos *et al.* 1979). Mediante complementación funcional de este tipo de mutantes (*exg1*), fue posible clonar e identificar dos fragmentos diferentes capaces de restablecer el fenotipo "hidrólisis MUG", uno de los fragmentos contenía el gen estructural *EXG1* y el segundo fragmento el gen *EXG2*.

EXG1 (Correa *et al.* 1992; Vázquez de Aldana *et al.* 1991) codifica una proteína extracelular con dos patrones de glicosilación diferentes que da lugar a las dos exo- β -1,3-glucanasas mayoritarias en los sobrenadantes de los cultivos de *S. cerevisiae*: Exgla o forma minoritaria y Exglb o forma mayoritaria (Farkas *et al.* 1973; Nebreda *et al.* 1987). Exg1p se localiza principalmente en el espacio periplásmico y en el medio de cultivo. El gen *EXG1* se ha vuelto a aislar recientemente junto a los genes *PBS2* y *PTC1* en un intento de clonación de genes que estuvieran implicados en el metabolismo del β -glucano (Jiang *et al.* 1995). La sobreexpresión del gen *EXG1* conduce a un descenso de los niveles de β -1,6-glucano de la pared celular y a un aumento de la resistencia a la toxina *killer* K1, mientras que la delección de *EXG1* incrementa los niveles de β -1,6-glucano de la pared produciéndose un fenotipo de hipersensibilidad a la toxina. Dado que ni la sobreexpresión del gen ni la interrupción generan variaciones apreciables en el contenido de β -1,3-glucano, estos resultados sugieren que, *in vivo*, el sustrato preferido por esta enzima sea el β -1,6-glucano y no el β -1,3-glucano como indican los ensayos *in vitro*.

El gen **EXG2** codifica una exo- β -1,3-glucanasa minoritaria con un elevado contenido en carbohidratos y que ha sido designada como ExgII. La comparación de secuencias de *EXG1* y *EXG2* muestra una elevada similitud entre ambas (Correa 1993). Solo un 5 % de la actividad exo- β -1,3-glucanasa producida por *EXG2* es detectada en el sobrenadante del cultivo. Experimentos de fraccionamiento subcelular muestran que la mayoría de la actividad está asociada a la pared celular, probablemente formando parte de las actividades β -glucanásicas descritas por Cenamor y cols. (1987) en lisados de protoplastos. La comparación de la secuencia aminoacídica de esta proteína con otras proteínas de levaduras asociadas a la pared celular, revela la existencia de una región C-terminal característica de polipéptidos anclados a la membrana a través de un anclaje GPI.

El gen **SSG1** (por *Sporulation Specific Glucanase*) (San Segundo *et al.* 1993) ha sido también caracterizado como *SPR1*, y fue identificado en un escrutinio de hibridación diferencial de genes que se transcriben preferentemente durante la esporulación (Muthukumar *et al.* 1993). *SSG1* codifica una actividad exo- β -1,3-glucanasa específica de esporulación que se transcribe durante la fase de meiosis y durante la formación de la espora, coincidiendo con la aparición de las primeras ascas maduras (San Segundo *et al.* 1993). El gen *SSG1* no es esencial para el proceso de esporulación, observándose solamente un retraso en la formación de las ascosporas en el mutante nulo.

La comparación entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes *EXG1*, *EXG2* y *SSG1* de *S. cerevisiae* muestra un elevado grado de similitud entre todos estos polipéptidos, con varios bloques peptídicos estrictamente conservados que, además, se mantienen en la secuencia de exoglucanasas caracterizadas en otras levaduras como *C. albicans* (Chambers *et al.* 1993), *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y *Schwanniomyces occidentalis* (Esteban *et al.* 1999a; Esteban *et al.* 1999b). El alineamiento conjunto de las secuencias aminoacídicas de las exo-1,3- β -glucanasas mencionadas muestra la existencia de varios bloques conservados de aminoácidos, posiblemente relacionados con la función catalítica o la unión al sustrato (Esteban *et al.* 1999). La comparación de secuencias y el análisis de grupos hidrofóbicos (HCA, por *Hydrophobic Cluster Analysis*), que permite detectar similitudes en polipéptidos que presentan baja identidad de secuencia (hasta un 10 %) e identificar dominios homólogos (Henrissat *et al.* 1989), ha permitido incluir este grupo de exo-1,3- β -glucanasas de levaduras como miembros pertenecientes a la familia 5 de glicosilhidrolasas, más conocida como familia A de celulasas, que está integrada principalmente por 1,4- β -endoglucanasas, aunque también incluye β -mananasas y β -xilanasas tanto de eucariotas como de procariotas (Henrissat 1991; Henrissat and Bairoch 1993). En este punto se ha de destacar que hay otra secuencia de *S. cerevisiae* que pertenece a esta familia y que presenta una elevada homología con las exo-1,3- β -glucanasas: YBR056W (Aljinovic and Pohl 1995; Vázquez de Aldana *et al.* 2000). Solo ocho residuos parecen estar estrictamente conservados entre los miembros de la familia A de celulasas, y constituir el sitio activo de la enzima (Cutfield *et al.* 1999), entre ellos dos glutamatos que actúan, uno como nucleófilo y otro como aceptor de protones, y la segunda histidina (H) y la tirosina (Y) que se muestran en el bloque DHHHY. El motivo conservado NEP incluye el glutámico considerado donador de protones para la ruptura del enlace β -O-glicosídico (Figura 9). Esto ha sido demostrado experimentalmente mediante estudios de mutagénesis dirigida en la celulasa EGZ de *Erwinia chrysanthemi* (Py *et al.* 1991), en endo-1,4- β -glucanasas producidas por *Bacillus subtilis* y *Bacillus polymyxa* (Baird *et al.* 1990), por *Clostridium thermocellum* (Navas and Beguin 1992; Wang *et al.* 1993), por *Tricoderma reesei* (Macarron *et al.* 1993) y en la exoglucanasa *XOG1* de *C. albicans* (Mackenzie *et al.* 1997).

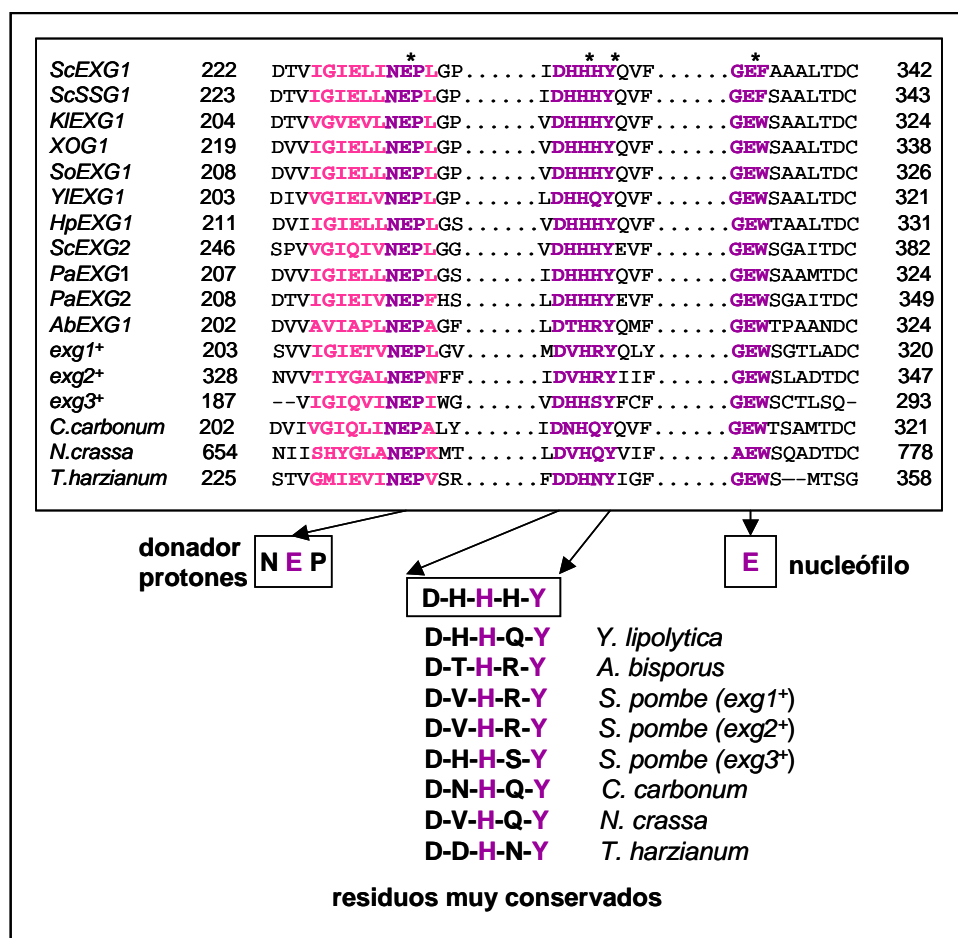


Figura 9: Exo-1,3-β-glucanasas de levaduras. Familia 5 de glicosilhidrolasas.

Sc: Saccharomyces cerevisiae. Kl: Kluyveromyces lactis. So: Schwanniomyces occidentalis. Yl: Yarrowia lipolytica. Hp: Hansenula polymorpha. Pa: Pichia anomala. Ab: Agaricus bisporus. C. carbonum: Cochiolobus carbonum. N. crassa: Neurospora crassa. T. harzianum: Tricoderma harzianum. S. pombe: Schizosaccharomyces pombe.

En *C. albicans* solo se ha detectado una enzima con actividad exo-β-1,3-glucanasa a la que se debe la casi totalidad de dicha actividad encontrada en el medio de cultivo de extractos celulares (Molina *et al.* 1987; Molina *et al.* 1989). Esta enzima es codificada por el gen **XOG1**. El análisis de la secuencia aminoacídica

ha permitido identificar un péptido señal en el extremo N-terminal. Xog1p no parece poseer posibles sitios de N-glicosilación. También se ha identificado el motivo NEP altamente conservado en muchas exoglucanasas y que parece ser esencial para la actividad catalítica de las mismas. Xog1p presenta un 58 % de identidad con su homóloga Exg1p de *S. cerevisiae* (Chambers *et al.* 1993a). La máxima expresión de Xog1p coincide con el inicio de la fase exponencial de crecimiento. Se han encontrado niveles semejantes de transcrito tanto durante el crecimiento levaduriforme como durante el crecimiento micelial (Chambers *et al.* 1993b). El mutante nulo del gen *XOG1* no se ve afectado ni en el crecimiento ni en la transición morfológica respecto de una cepa silvestre. Sí se han observado algunas diferencias sutiles, el mutante *xog1* presenta una mayor susceptibilidad a inhibidores de la síntesis de glucano y una mayor resistencia a nikomicina Z, un inhibidor de la síntesis de quitina. También se ha observado en un modelo murino de infección sistémica experimental que el mutante nulo es tan patógeno como una cepa silvestre (González Garcés *et al.* 1997). Xog1p cataliza una eficaz reacción de transglicosilación *in vitro* (Sullivan *et al.* 1990) que ha sido estudiada en mayor profundidad muy recientemente, observando que dicha reacción depende de la concentración de sustrato, pudiendo ser 10 veces más rápida que la reacción de hidrólisis si hay un exceso de sustratos como laminaritrinsa y laminarihexosa (Stubbs *et al.* 1999). Esto indicaría que Xog1p pudiera estar implicada en el reordenamiento del β -glucano de la pared celular.

Mediante el empleo de oligonucleótidos degenerados contruídos tomando como referencia las zonas de mayor similitud de la secuencia de las exoglucanasas de *S. cerevisiae*, se han clonado otros dos genes de *C. albicans*: *CaEXG2* y *CaEXG3*, de los que habrá que demostrar una posible actividad exohidrolítica (Vázquez de Aldana *et al.* 2001).

Hasta la fecha, además de los genes ya mencionados que codifican para exo-1,3- β -glucanasas, se han descrito tres exoglucanasas de *Schizosaccharomyces pombe*, *exg1*⁺, *exg2*⁺ y *exg3*⁺, (Vázquez de Aldana *et al.* 2000) y se han purificado dos actividades exo-1,3- β -glucanasas en el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (Fontaine *et al.* 1997a) También se conocen los genes que codifican para exo-1,3- β -glucanasas de otras especies fúngicas como *Cochliobolus carbonum* (Schaeffer *et al.* 1994), *Agaricus bisporus* (van de Rhee *et al.* 1996), *Pichia anomala* (*PaEXG1* y *PaEXG2*), *Tricoderma harzianum*, *Tricoderma atroviridae* y *Ampelomyces quisqualis* (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf>).

B) Endo- β -glucanasas.

Hasta la fecha se han caracterizado varios genes que codifican proteínas con actividad endo- β -glucanasa en levaduras. Por ejemplo el gen **BGL2** de *S. cerevisiae* que codifica una glicoproteína de 29 kDa (gp29) asociada a la pared celular y que se fija de forma específica a polímeros como quitina y glucano (Klebl and Tanner 1989;

Mrsa *et al.* 1992). Su secuencia de aminoácidos presenta ciertas similitudes con β -glucanasas de origen vegetal, pero no tiene homología con las codificadas por los genes *EXG1*, *EXG2* y *SSG1* de *S. cerevisiae*. Bgl2p fue descrita en primer lugar como una exo-1,3- β -glucanasa (Klebl and Tanner 1989), comprobándose posteriormente su actividad endo-1,3- β -glucanasa (Mrsa *et al.* 1993) y más recientemente le ha sido asignada una actividad glicosiltransferasa (Goldman *et al.* 1995) que ya había sido descrita en la proteína homóloga de *C. albicans*. Esta enzima funciona como glucanasa cuando la concentración de la molécula aceptora es baja; sin embargo, cuando la concentración del aceptor es elevada, la reacción predominante es la de transglicosilación, que consiste en la hidrólisis de un disacárido de glucosa de una molécula de β -1,3-glucano y posterior transferencia al extremo no reductor de una nueva cadena de este polímero, generándose un enlace β -1,6 en el sitio de la transferencia. La disrupción de *BGL2* no provoca ningún fenotipo drástico en la célula (Klebl and Tanner 1989). Recientemente se ha puesto de manifiesto que algunos mutantes que presentan un fenotipo de sensibilidad a baja osmolaridad (mutantes *hpo*, por *hypo-osmolarity*) y que tienen un defecto en el gen *PKC1*, sobreexpresan una proteína asociada a las paredes celulares que ha resultado ser Bgl2p. Estos mutantes presentan hasta un 30 % menos de glucano en su pared. La construcción de un doble mutante *hpo2* Δ *bgl2* mejora parcialmente el defecto en la tasa de crecimiento de un mutante *hpo2*, así como de un mutante *pkc1*, aunque no suprime otros defectos como la dependencia de un estabilizador osmótico y la morfología celular anormal, lo que sugiere que, aunque *PKC1* regule negativamente a *BGL2*, debe de haber otros genes regulados por *PKC1* involucrados en el metabolismo de la pared celular, entre los que pueden encontrarse otras β -glucanasas (Shimizu *et al.* 1994).

Capellaro y cols., en un estudio de proteínas liberadas de la pared celular mediante la extracción con SDS en condiciones reductoras y previo marcaje de las mismas con un reactivo no permeable, identificaron, entre otras proteínas, la exo-1,3- β -glucanasa Exg1p, la endo-1,3- β -glucanasa Bgl2p y tres proteínas desconocidas Scw3p, Scw4p y Scw10p (por *Soluble Cell Wall Proteins*) que presentaban una homología significativa con glucanasas. La secuencia de aminoácidos de **Scw4p** y **Scw10p** está muy relacionada con la de Bgl2p, mostrando un 49-56 % de similitud y un 27-29 % de identidad. Los mutantes nulos de estos genes no producen ningún fenotipo relevante. Los mutantes dobles *scw4* *scw10* manifiestan un crecimiento más lento, un aumento en la liberación de proteínas de la pared celular de células intactas tras tratamiento con DTT, y una disminución en la eficacia de apareamiento, respecto de una cepa silvestre. Dichas manifestaciones se ven contrarrestadas en parte cuando se deleciona también el gen *BGL2*. Estos resultados son interpretados como un posible balance entre actividades glucanasa y transglicosidasa (Capellaro *et al.* 1998).

La proteína **Bgl2p** de *C. albicans* fue aislada como un producto de purificación de una endo-1,3- β -glucanasa de un cultivo de este hongo (Hartland *et al.* 1991), comprobándose una actividad β -1,3-glicosiltransferasa (Hartland *et al.* 1991; Goldman *et al.* 1995). La carencia de este gen provoca una atenuación ligera de la virulencia

con respecto a la cepa silvestre, cuando se ensaya en un modelo murino. El mutante es más susceptible al inhibidor de la síntesis de quitina nikomicina Z, lo que podría indicar que la pérdida de esta enzima hace que las células sean más dependientes de quitina para su integridad celular. No se han observado diferencias significativas en los niveles de β -1,3 y β -1,6-glucano entre el mutante nulo y la cepa silvestre. La presencia de actividad residual β -1,3-glicosiltransferasa en el mutante *bgl2* sugiere la existencia de otras actividades redundantes (Sarchy *et al.* 1997).

También se ha aislado una actividad β -1,3-glicosiltransferasa de las paredes celulares de *C. utilis* (Kalebina *et al.* 1998) y de *A. fumigatus* (Klebl and Tanner 1989; Mouyna *et al.* 1998). La caracterización bioquímica y molecular de esta glicosiltransferasa en *A. fumigatus* muestra una elevada homología con Bgl2p de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Un mutante nulo de esta proteína no manifiesta ninguna diferencia fenotípica respecto a la cepa parental.

Recientemente, en *S. cerevisiae* se han clonado y caracterizado dos genes, **ENG1** y **ENG2** que codifican dos proteínas con actividad endo-1,3- β -glucanasa (Baladrón García 1997) y que corresponden a los marcos abiertos de lectura YNR067c e YLR144c, respectivamente, disponibles en las bases de datos que almacenan la información correspondiente al genoma de esta levadura.

Mediante el empleo de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de los bloques de mayor homología entre las secuencias aminoacídicas de las exo-1,3- β -glucanasas codificadas por los genes *EXG1*, *EXG2* y *SSG1*, por PCR se obtuvieron varias sondas, una de las cuales permitió detectar mediante un ensayo tipo "colony blot" un fragmento de DNA con actividad β -1,3-glucanásica frente a laminarina. Acotando la zona mínima responsable de dicha actividad y secuenciando posteriormente, se localizó el marco abierto de lectura *ENG1* de 3351 pb. que codifica un polipéptido de 1117 aminoácidos con 9 posibles sitios de N-glicosilación y un alto grado de O-glicosilación. La proteína que codifica, Eng1p, presenta un dominio marcadamente hidrofóbico en el extremo aminoterminal, típico de las secuencias señal de las proteínas que entran en la ruta de secreción. El gen *ENG1* mapea en el brazo derecho del cromosoma XIV. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida con las bases de datos disponibles del genoma de *S. cerevisiae* permitió detectar una sola secuencia capaz de codificar un polipéptido con una homología significativa a Eng1p. Se trataba de una de las fases de lectura abierta detectadas en el brazo derecho del cromosoma XII, el gen YLR144c o *ENG2* de 2337 pb. que codifica un polipéptido de 779 aminoácidos con actividad β -1,3-glucanásica frente a laminarina. El análisis de la secuencia aminoacídica permitió señalar la existencia de 6 sitios posibles de N-glicosilación y 4 de O-glicosilación. No parece existir ningún dominio claramente hidrofóbico en el extremo N-terminal indicativo de la existencia de una secuencia señal. Ambas proteínas presentan un 38 % de identidad y un 50 % de similitud considerando la región en que sus secuencias son alineadas. Hay que destacar que ambas secuencias poseen el motivo D-H-H-F-H-Y, semejante al llamado "bloque de histidinas" D-H-H-H-Y característico de las exo- β -glucanasas, aunque con

una ligera modificación al estar intercalada una fenilalanina entre la segunda y la tercera histidina.

Los estudios de expresión de los genes *ENG1* y *ENG2* han puesto de manifiesto que ambos se expresan durante el ciclo vegetativo de *S. cerevisiae*, mientras que durante la esporulación se produce una inhibición total de la expresión de *ENG1* y una fuerte activación del gen *ENG2*. Durante el proceso de germinación de las ascas, tiene lugar una recuperación de los niveles vegetativos, tanto del mensajero de *ENG1* como del mensajero de *ENG2*. Al tratar células de tipo sexual a con factor α , la cantidad de mRNA de *ENG1* aumenta considerablemente a los 30 min. del inicio de dicho tratamiento, aunque *ENG1* no presenta señales de inducción por feromonas y su delección no afecta a la capacidad de conjugación. Los ensayos de actividad β -glucanásica en fracciones de paredes celulares, sobrenadantes de extractos celulares y sobrenadantes de caldos de cultivo de células *exg1 exg2* transformadas con plásmidos multicopia de ambos genes, han permitido conocer que Eng1p se secreta mayoritariamente al espacio periplásmico y luego al medio de cultivo. La eliminación de los genes *ENG1* y *ENG2* o la sobreexpresión de los mismos no tiene efectos aparentes sobre diferentes parámetros estudiados, como el aspecto celular, la capacidad de crecimiento en medio líquido, la gemación, la resistencia a zimoliasa 100 T y a la toxina *killer* de *S. cerevisiae*, la conjugación, la esporulación y la germinación. Cabe destacar alguna diferencia pequeña: cuando se sobreexpresa el gen *ENG1*, disminuye la velocidad de crecimiento, y durante la esporulación, la delección conjunta de *SSG1* y *ENG2* hace que la cepa recupere el fenotipo silvestre, mientras que un mutante sencillo *ssg1* presenta un retraso en la aparición de las ascas.

El gen *ENG2* también ha sido identificado en una búsqueda de factores que intervienen en la polimerización de actina en células de levadura permeabilizadas, y se ha denominado *ACF2* (por *A*ssembly *C*omplementing *F*actor) o *PCA1* (por *P*olarized *C*ortical *A*ctin *A*ssembly) (Lechler and Li 1997). Esta proteína presenta en el extremo aminoterminal dos secuencias ricas en prolina que serían posibles dominios SH3 (por *S*rc *h*omology *3* domains), que son dominios indicativos de una proteína involucrada en la transducción de señales relacionada con la organización del citoesqueleto. La primera proteína en la que se describió este dominio fue la tirosina kinasa humana Src (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam). En el extremo carboxiterminal de Pca1p existen dos dominios de tipo "plecstrina" (PH, del inglés *P*lekstrin *H*omology domain), que aparecen en proteínas eucariotas implicadas en señalización intracelular o proteínas que son componentes del citoesqueleto pero cuya función es aún poco conocida. El término "tipo plecstrina" es debido a que la primera proteína en la que se detectó este dominio es la plecstrina, el principal sustrato de la proteína kinasa C en las plaquetas (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam). Estos dominios PH podrían servir como anclaje de la proteína a la membrana. El mutante nulo $\Delta acf2$ es viable, no presentando defectos aparentes ni en la organización de actina ni en la morfología celular, sugiriendo que esta posible falta de fenotipo puede ser debida a una redundancia funcional, fenómeno muy común en lo que se refiere a funciones importantes relacionadas con el citoesqueleto de actina. Se han aislado varias mutaciones que son sintético letales con

un mutante nulo $\Delta acf2$ (Hayne *et al.*, sin publicar, citado en Lechler and Li 1997), lo que sugiere que otras proteínas pueden sustituir funcionalmente a Pca1p *in vivo*.

También se han descrito proteínas con actividad glicosídica de tipo endohidrolítico en otros hongos. Se ha purificado una endo-1,3- β -glucanasa de la pared celular del hongo oportunista patógeno *A. fumigatus* (Fontaine *et al.* 1997b), cuya actividad representa solo el 10-15 % del total de la actividad 1,3- β -glucanasa encontrada en lisados de la pared celular de este hongo. El hongo filamentoso *Tricoderma harzianum* produce varias actividades hidrolasas del β -glucano, al menos tres actividades endo-1,3- β -glucanasa, una de las cuales ha sido caracterizada (de la Cruz *et al.* 1995a) y otras dos actividades endo-1,6- β -glucanasa conocidas (de la Cruz *et al.* 1995b; de la Cruz and Llobell 1999; Lora *et al.* 1995), todas ellas muy importantes en el micoparasitismo de *Tricoderma* en hongos patógenos de plantas. También se conocen dos actividades endohidrolíticas de la levadura de fisión *S. pombe*: *eng2+*, que parece ser necesaria para el cambio de crecimiento monopolar a bipolar y *eng3+*, requerida para la separación celular. Esta última proteína se expresa periódicamente durante el ciclo celular y parece localizarse en el septo, como lo demuestran experimentos de unión a la proteína GFP (Vázquez de Aldana *et al.* 2001).

Tabla 1: Relación de las glucanasas descritas en *S. cerevisiae* y en *C. albicans*.

GEN <i>S. cerevisiae</i>	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	LOCALIZACIÓN CELULAR	REFERENCIA
EXG1	Exgla, Exglb Exoglucanasa (β -1,3 β -1,6)	Espacio periplásmico y medio de cultivo.	(Vázquez de Aldana <i>et al.</i> 1991)
EXG2	ExgII Exoglucanasa (β -1,3 β -1,6)	Pared celular.	(Correa 1993)
SSG1/SPR1	Exoglucanasa (β -1,3 β -1,6)	Pared ascosporas.	(San Segundo <i>et al.</i> 1993) (Muthukumar <i>et al.</i> 1993)
YBR056w	Exoglucanasa	¿?	(Vázquez de Aldana <i>et al.</i> 2000)
BGL2	Endo-1,3- β -glucanasa Glicosiltransferasa	Pared celular.	(Klebl and Tanner 1989) (Mrsa <i>et al.</i> 1993) (Goldman <i>et al.</i> 1995)
ENG1	Endo-1,3- β -glucanasa	Espacio periplásmico y medio de cultivo.	(Baladrón García 1997)
ENG2/ACF2	Endo-1,3- β -glucanasa Factor que interviene en la polimerización de actina.	¿?	(Baladrón García 1997) (Lechler and Li 1997)
SCW4	¿Endoglucanasa? ¿Transglicosidasa?	Pared celular.	(Cappellaro <i>et al.</i> 1998)
SCW10	¿Endoglucanasa? ¿Transglicosidasa?	Pared celular.	(Cappellaro <i>et al.</i> 1998)
CTS1	Quitinasa	Pared celular y medio de cultivo.	(Elango <i>et al.</i> 1982) (Kuranda and Robbins 1987) (Kuranda and Robbins 1991)
AMS1	α -manosidasa	Membrana vacuolar.	(Kuranda and Robbins 1987)
GEN <i>C. albicans</i>	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	LOCALIZACIÓN CELULAR	REFERENCIA
XOG1	Exo-1,3- β -glucanasa Glicosiltransferasa.	Espacio periplásmico y medio de cultivo.	(Chambers <i>et al.</i> 1993)
BGL2	Endo-1,3- β -glucanasa Glicosiltransferasa	Pared celular.	(Hartland <i>et al.</i> 1991) (Goldman <i>et al.</i> 1995) (Sarthy <i>et al.</i> 1997)
CHT1	Quitinasa	¿Pared celular?	(McCreath <i>et al.</i> 1995) (McCreath <i>et al.</i> 1996)
CHT2	Quitinasa	Pared celular y medio de cultivo.	(McCreath <i>et al.</i> 1995)
CHT3	Quitinasa	Pared celular y medio de cultivo.	(McCreath <i>et al.</i> 1995)

III. *Candida albicans* COMO AGENTE PATÓGENO.

En los últimos años se ha producido un notable incremento de las infecciones fúngicas, siendo *C. albicans* el principal agente etiológico de este tipo de infecciones. Este hecho, junto con el desconocimiento de la fisiología de *C. albicans*, ha hecho imprescindible el estudio de este microorganismo que hoy podemos considerar como un modelo de hongo patógeno.

Candida albicans es un hongo **unicelular** que se clasifica dentro de la clase *Deuteromycetes*, que comprende **hongos imperfectos** por carecer de ciclo sexual, dentro de la subclase *Blastomycetidae* y la familia *Cryptococcaceae*. Recientemente, sin embargo, se ha descrito la existencia de la posibilidad de un proceso de tipo sexual en este microorganismo. Este género incluye más de 200 especies de levaduras muy diferentes, con características comunes como la reproducción asexual multilateral y la carencia de ascosporas.

Dentro del género *Candida* tan sólo una decena de especies causan patologías infecciosas en el hombre, y de éstas, sólo 3 ó 4 ocasionan más del 90 % de las micosis. *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada en candidiasis, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. krusei*, *C. dublinensis* y *C. pseudotropicalis* (Hazen 1995). *C. albicans* se caracteriza por ser un microorganismo **diploide** y **dimórfico**, siendo la única especie de este género capaz de formar verdaderos micelios. Este microorganismo presenta una distribución universal, siendo el hombre un portador habitual de esta levadura que está presente en un 50 % de la población, bien en el tracto digestivo como parte de la flora normal o en la flora vaginal (se detecta en un 5 % de las mujeres sanas y hasta en un 30 % de las gestantes).

Las candidiasis o infecciones por *Candida* se clasifican en superficiales y profundas. Las **candidiasis superficiales** afectan a piel y mucosas e incluyen, entre otras, las candidiasis vaginal, oral y mucocutánea crónica. Las **candidiasis profundas** pueden ser localizadas cuando afectan a uno o más órganos, aunque generalmente van acompañadas de septicemias, denominándose entonces candidiasis diseminada o sistémica. La infección se produce, normalmente, por una alteración del equilibrio entre el hospedador y la levadura. Si bien las candidiasis son poco frecuentes en individuos sanos, las infecciones sistémicas por *Candida* son particularmente difíciles de diagnosticar y tratar, resultando en ocasiones fatales. El aumento de pacientes con inmunodeficiencias como consecuencia de la aparición del SIDA, el mayor número de pacientes sometidos a inmunosupresión (tratamientos post-transplante, procesos tumorales, etc.), la utilización de antibióticos de amplio espectro o las técnicas hospitalarias invasivas, han contribuido al aumento de este tipo de infecciones.

El **dimorfismo** es una característica de *C. albicans* que se ha relacionado con su capacidad de ser patógeno. Sin embargo, ha de considerarse un hongo polimórfico puesto que este microorganismo puede presentarse con distintas morfologías (Odds

1988). La forma de **levadura** o **blastospora** es la forma unicelular del hongo. Son células elipsoidales que se reproducen por gemación. Este proceso implica la aparición de una nueva célula en un punto concreto de la superficie celular, que va creciendo hasta alcanzar el tamaño de la célula madre, a continuación se produce la división nuclear y, posteriormente, se forma el septo de separación entre ambas células. Se generan así dos blastosporas indistinguibles, a no ser por la cicatriz que presenta la célula madre en el punto de gemación. Las **hifas** son filamentos delgados cilíndricos, constituidos por células separadas por septos que permanecen comunicadas por un orificio. Se forman como ramas a partir de otras hifas ya formadas o por germinación de levaduras, en este último caso, de la blastospora emerge una estructura cilíndrica llamada tubo germinativo que crece continuamente por extensión. Las hifas, a su vez, pueden formar blastosporas secundarias por gemación lateral. El **micelio** es el conjunto de hifas, ramificaciones y gemaciones laterales. *C. albicans* también es capaz de crecer formando **pseudohifas**. Éstas son, en realidad, levaduras más alargadas que no se han separado totalmente y que, por tratarse de células totalmente formadas, pueden ser separadas mecánicamente. También, en determinadas condiciones de cultivo *in vitro*, algunas células de las hifas de *C. albicans* pueden engrosar su pared y producir formas de resistencia o **clamidosporas**.

La capacidad de este microorganismo de pasar de la fase levaduriforme a la micelial, se conoce como **transición morfológica** (figura 10), y es un proceso reversible que puede inducirse *in vitro* en respuesta a diversos factores: de tipo ambiental, como el pH (alrededor de 7) y la temperatura (entre 37 y 40 °C); la concentración de células (entre 5×10^5 y 10^6 cél.mL⁻¹); factores nutricionales como la presencia de N-acetil glucosamina, prolina, biotina, el grupo hemo, los compuestos sulfhidrilo, el zinc y el suero.

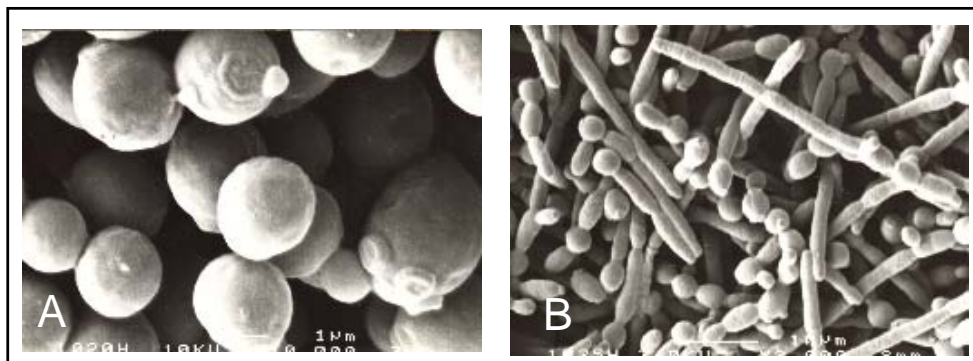


Figura 10: Transición dimórfica de *C. albicans*.

Morfología celular de las blastosporas o levaduras (A) y de las hifas (B) observadas en el microscopio electrónico de barrido (fotos cedidas por Gil, C. y Pérez-Díaz, R.M.)

Eliminado: 11

Con formato

Factores de virulencia.

En individuos sanos existe un equilibrio entre *C. albicans* como comensal y el hospedador. Este equilibrio se mantiene gracias a la competencia con la flora bacteriana normal, la integridad de piel y mucosas y la actividad del sistema inmunológico, especialmente la inmunidad denominada celular. La infección por *C. albicans* se establece cuando este equilibrio es alterado, ya sea por cambios en el hongo, por la desaparición del freno que supone la flora bacteriana, por la incapacidad del huésped para defenderse de la levadura o por la entrada de la misma a zonas que deben permanecer estériles. Dentro de todos los factores que contribuyen a la adquisición de candidiasis, detallamos a continuación aquellos que dependen del hongo y que pueden ser considerados factores de virulencia (Navarro-García *et al.* 2001):

- La **capacidad de adherencia** a células y otros materiales, debida en gran medida a numerosas manoproteínas de las células fúngicas, a la quitina (Ghannoum and Abu-Elteen 1991) y a adhesinas tipo fimbrias (Yu *et al.* 1994).

- El **dimorfismo** o transición dimórfica ya comentado. Las hifas facilitan la rotura del macrófago durante el proceso de fagocitosis y con ello, la muerte del mismo (Díez-Orejas *et al.* 1999) Los filamentos se adhieren más y secretan más cantidades de enzimas hidrolíticas que las formas levaduriformes (Senet 1998).

- La **variabilidad genética**. En *C. albicans* se ha descrito un elevado grado de recombinación mitótica (Whelan and Soll 1982) así como un gran número de reorganizaciones cromosómicas (Chu *et al.* 1993). Estos mecanismos generarían variabilidad genética en ausencia de ciclo meiótico en esta levadura.

- Las **enzimas extracelulares** que este microorganismo es capaz de secretar: proteinasas, fosfolipasas, etc. Cepas deficientes en estas proteinasas son menos letales para el ratón, como lo han demostrado estudios realizados en animales de experimentación.

- La **variabilidad antigénica**. Este mecanismo permite a la levadura escapar del sistema inmunitario del hospedador. *C. albicans* es capaz de llevar a cabo, aparte de la transición morfológica, otro tipo de cambios como la transición white-opaque (Soll 1990) y la de tipo-3153A (Slutsky *et al.* 1985).

- La **hidrofobicidad** de la levadura, una característica de la superficie celular de este microorganismo que permite una mejor adhesión a la superficie de las células que ataca.

- Los **efectos sobre el sistema inmunitario del huésped**. Experimentos de laboratorio han demostrado que *C. albicans* es capaz de modular la respuesta inmune del huésped. Aunque se desconocen los mecanismos, parece ser que este microorganismo inhibe la liberación de agentes oxidantes por parte de las células fagocíticas (Chinen *et al.* 1999), de manera que es capaz de inhibir su propia

destrucción. Por otro lado, *C. albicans* produce una proteínasa capaz de degradar parte de la respuesta humoral (IgG y proteínas del complemento) del hospedador (Kaminishi *et al.* 1995).

Terapia antifúngica.

En la actualidad contamos con un escaso arsenal de compuestos antifúngicos, y ninguno de ellos es ideal para el tratamiento de las diferentes micosis. En la última década se ha experimentado un incremento significativo de la resistencia a agentes antibacterianos y antifúngicos que conlleva implicaciones importantes en la morbilidad, mortalidad y el coste sanitario. Por este motivo, se ha centrado la atención en una mayor comprensión de los mecanismos de resistencia, una mejora de los métodos para detectar los mismos, la búsqueda de nuevos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes y métodos para prevenir la diseminación de las resistencias. Durante casi 30 años, la anfotericina B, un compuesto poliénico que causa una elevada nefrotoxicidad, fue el único antifúngico disponible para el control de infecciones fúngicas graves. La aparición de los imidazoles y los triazoles al final de los años 80 y 90, supuso un avance sustancial en el tratamiento seguro y efectivo de infecciones fúngicas, tanto locales como sistémicas. Sin embargo, el alto perfil de seguridad de los triazoles, en particular del fluconazol, ha conducido a un uso indiscriminado del mismo que ha llevado a un aumento de resistencias (Ghannoum and Rice 1999). Otra desventaja que presentan los actuales antifúngicos es que existe muy poca diferencia entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica.

El aislamiento o identificación de un antifúngico que presente una alta actividad con un amplio espectro de acción, que además sea selectivo para el hongo y por tanto no tóxico para el huésped, con una buena farmacocinética, de fácil administración y que no genere resistencias, es uno de los objetivos prioritarios de la investigación farmacéutica en este campo.

Los antifúngicos de que disponemos en la actualidad actúan sobre diferentes dianas y tienen mecanismos de acción diversos. Así, encontramos un grupo de antifúngicos que actúan inhibiendo la síntesis o interaccionando directamente con el ergosterol, el componente predominante de la membrana fúngica. Dicho grupo está integrado por los **azoles**, los **polienos** y las **alilaminas/tiocarbamatos**, y constituyen los agentes antifúngicos de mayor empleo en clínica.

Entre los compuestos cuyo mecanismo de acción consiste en la interferencia con la biosíntesis de los ácidos nucleicos, se encuentra la **5-fluorocitosina**, un potente inhibidor de la ruta de biosíntesis de las bases pirimidínicas. La promesa inicial que supuso este agente se ha visto disminuida por la prevalencia de resistencias en numerosas especies fúngicas. Actualmente, la 5-fluorocitosina se usa en terapia combinada con otros antifúngicos, como la anfotericina B y el fluconazol.

Otro grupo de antifúngicos está constituido por aquellos que actúan bloqueando la funcionalidad de la pared celular, ésta es *a priori* la mejor diana antifúngica al no estar presente en las células de los mamíferos, asegurándose así, en principio, la selectividad y la baja toxicidad. La mayoría de los agentes descritos en los últimos 10 años con actividad a este nivel no han superado en muchos casos la fase de investigación, debido curiosamente a sus efectos tóxicos en células de mamíferos, motivo por el cual no se dispone en muchos casos de datos clínicos. Los inhibidores de la síntesis de quitina, como las **nikomicinas**, han sido investigados en profundidad, pero no han llegado a comercializarse. Las **benanomicinas** y **pradimicinas**, que interaccionan con la fracción polisacáridica de las manoproteínas, tampoco parecen ser útiles para uso clínico. De los inhibidores de la síntesis de glucano: **aculeacinas**, **equinocandinas** y **papulocandinas**, solo el grupo de las equinocandinas ha llegado a una fase clínica de experimentación, evaluándose su seguridad y eficacia frente a candidiasis. Estos antifúngicos tienen actividad fungicida *in vivo* e *in vitro* frente a diferentes especies de *Candida* y de *Aspergillus*. El compuesto MK-0991 o caspofungina, derivado de la pneumocandina y los compuestos anidulafungina y micafungina, derivados de la equinocandina B, están en fase clínica de investigación (Tkacz and DiDomenico 2001). Estudios preliminares en pacientes con candidiasis de mucosas indican que la caspofungina es tolerada mejor que la anfotericina B e igual que el fluconazol (Keating and Jarvis 2001). Muy recientemente se ha conocido la existencia de otros dos compuestos con actividad antifúngica mediante mecanismos diversos. Uno de ellos, la cromofungina, un péptido que por una parte parece desestabilizar la pared celular y la membrana plasmática y que por otra parte parece actuar intracelularmente inhibiendo la activación de enzimas dependientes de calmodulina (Lugardon *et al.* 2001). El segundo compuesto se conoce como HWY-289 y es una protoberberina semisintética que interfiere con la síntesis del ergosterol de la membrana plasmática fúngica y que también inhibe las quitina sintasas *CaCHS1* y *CaCHS2* (Park *et al.* 2001).

Los nuevos miembros del grupo de los azoles: el voriconazol y el ravuconazol (relacionados con el fluconazol) y el posaconazol (relacionado con el itraconazol), tienen mayor potencia y un espectro más amplio que los azoles precedentes. Dicho espectro de acción incluye una elevada actividad frente a levaduras resistentes al fluconazol. La farmacocinética de estos compuestos es favorable, lo que permitirá su próxima valoración en ensayos clínicos humanos. Estudios previos con voriconazol y posaconazol han sido positivos, ambos son mejor tolerados que la anfotericina B (Tkacz and DiDomenico 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO.

Las cepas de *Candida albicans* empleadas en este trabajo y las construídas en el transcurso del mismo, se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente. La cepa de *Escherichia coli* utilizada en los trabajos de Biología Molecular fue DH5 α (Hanahan 1988), cuyo genotipo es: K-12 Δ (*lacZYA-argF*)_{u169} *deoR supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 ϕ 80lacZ Δ M15*)F'. La cepa de *Williopsis mrakii* empleada en los ensayos de sensibilidad a la toxina *killer* fue NCYC 500 (Walker *et al.* 1995).

Tanto las cepas de *Candida albicans* como las de *Escherichia coli* fueron crecidas rutinariamente a una temperatura de 37 °C. *W. mrakii* se creció a 25 °C.

El crecimiento de los cultivos se determinó mediante la medida de la turbidez de los mismos por lectura de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Las muestras se diluían convenientemente para que su absorbancia se encontrara en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de la densidad óptica y el número de células.

La determinación de la concentración de levaduras en un cultivo se llevó a cabo mediante recuento en una cámara de Neubauer por observación microscópica directa en un microscopio de contraste de fases.

Tabla 2: Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
SC5314	Silvestre	(Gillum <i>et al.</i> 1984)
CAF2	Δ ura3:: <i>imm434</i> /URA3	(Fonzi and Irwin 1993)
CAI4	Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i>	(Fonzi and Irwin 1993)
CNC30a	XOG1/ <i>xog1::hisG-URA3-hisG</i> Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i>	(González Garcés <i>et al.</i> 1997)
CNC31a	XOG1/ <i>xog1::hisG</i> Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i>	(González Garcés <i>et al.</i> 1997)
CNC32a*	<i>xog1::hisG/xog1::hisG-URA3-hisG</i> Δ ura3:: <i>imm434</i> / Δ ura3:: <i>imm434</i>	(González Garcés <i>et al.</i> 1997)

* La nomenclatura abreviada de esta cepa, empleada en este trabajo, es **xog1**.

Tabla 3: Cepas de *C. albicans* obtenidas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Nomenclatura abreviada
CNC61	<i>ENG1/Δeng1::hisG-URA3-hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC62	<i>ENG1/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC63	<i>Δeng1::hisG/Δeng1::hisG-URA3-hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	Δeng1
CNC64	<i>Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC71	<i>XOG1/xog1::hisG-URA3-hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC72	<i>XOG1/xog1::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC73	<i>xog1::hisG-URA3-hisG/ xog1::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	Δeng1 xog1
CNC74	<i>xog1::hisG/ xog1::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC75	<i>Δeng1::hisG/ENG1 URA3 xog1::hisG/ xog1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	ENG1 Δeng1 xog1
CNC76	<i>LEU2/leu2::ACT1^{PR}-ENG1-URA3 xog1::hisG/xog1::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	ACT1^{PR}-ENG1 Δeng1 xog1
CNC81	<i>ENG2/Δeng2::hisG-URA3-hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC82	<i>ENG2/Δeng2::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC85	<i>ENG2/Δeng2::hisG-URA3-hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC86	<i>ENG2/Δeng2::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC87	<i>Δeng2::hisG/Δeng2::hisG-URA3-hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	Δeng1 Δeng2
CNC88	<i>Δeng2::hisG/Δeng2::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC89	<i>Δeng1::hisG/ENG1 URA3 Δeng2::hisG/Δeng2::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	ENG1 Δeng1 Δeng2
CNC91	<i>XOG1/xog1::hisG-URA3-hisG Δeng2::hisG/Δeng2::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC92	<i>XOG1/xog1::hisG Δeng2::hisG/Δeng2::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	
CNC93	<i>xog1::hisG-URA3-hisG/ xog1::hisG Δeng2::hisG/Δeng2::hisG Δeng1::hisG/Δeng1::hisG Δura3::λimm434/Δura3::λimm434</i>	Δeng1 Δeng2 xog1

2. MEDIOS DE CULTIVO.

Aquellos medios en los que no se especifica la cita bibliográfica original, están descritos en el manual de referencia Sambrook y cols. (Sambrook *et al.* 1989).

Tabla 4: Medios de cultivo empleados.

Medio	Composición	Utilidad. Referencia.
LB (Luria-Bertani)	10 g/L bacto triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5-10 g/L NaCl	Medio rico para el crecimiento de bacterias suplementado con ampicilina (100 µg/mL) para la selección de transformantes portadores de plásmidos
YPD	20 g/L glucosa, 20 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura.	Medio completo para el cultivo de levaduras
YED	20 g/L glucosa, 10 g/L extracto de levadura.	Medio rico para el crecimiento de levaduras (Sherman <i>et al.</i> 1986)
Medio Mínimo (MM)	20 g/L glucosa, 5 g/L sulfato amónico, 1,7 mg/L base nitrogenada (Difco) y 140 mL/L mezcla de aminoácidos*.	Medio sintético para el cultivo de levaduras que no permite el crecimiento de cepas auxótrofas
MM 5-FOA	Medio mínimo suplementado con 25 mg/L de uridina y 1 mg/L de ácido 5-fluoroorótico.	Medio de selección para cepas auxótrofas para uracilo. El 5-FOA actúa como antimetabolito para cepas con el gen <i>URA3</i> funcional. (Boeke <i>et al.</i> 1987)
SLAD (Synthetic Low-Ammonium Dextrose)	6,7 g/L base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico, 20 g/L glucosa, 0,05 mM sulfato amónico.	Medio mínimo que induce crecimiento invasivo o pseudofilamentoso en <i>S. cerevisiae</i> (Gimeno <i>et al.</i> 1992).
Spider	10 g/L manitol, 10 g/L caldo nutritivo (1 g/L extracto vaca, 2 g/L extracto levadura, 5 g/L peptona, 5 g/L NaCl), 2 g/L K ₂ HPO ₄ y 13,5 g/L agar.	Medio inductor de crecimiento invasivo o filamentoso en <i>C. albicans</i> (Liu <i>et al.</i> 1994).
Medio de Lee	0,2 g/L sulfato magnésico, 2,5 g/L fosfato dipotásico (estas dos soluciones preparadas por separado), 5,0 g/L cloruro sódico, 5 g/L sulfato amónico, 0,5 g/L L-alanina, 1,3 g/L L-leucina, 1,0 g/L L-lisina, 0,1 g/L L-metionina, 0,07 g/L L-ornitina, 0,5 g/L L-fenilalanina, 0,5 g/L L-prolina, 0,5 g/L L-treonina. Ajustado el pH a 6,7 y autoclavado. Adicionar 25 mL/L glucosa 50 % y 1 mL/L biotina 0,1 %. (esterilizados por filtración).	Medio para inducir filamentación en <i>C. albicans</i> (Lee <i>et al.</i> 1975).
Suero (STF)	Suero de ternera fetal	Medio inductor de filamentación en <i>C. albicans</i> .
MBA (Medio con azul de metileno)	10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucosa y 20 g/L de agar, en buffer citrato/fosfato a pH 4,5. Añadir 0,003 % (p/v) de azul de metileno y 5 % (v/v) de glicerol después de autoclavar.	Medio para determinación semicuantitativa del efecto <i>killer</i> (Walker <i>et al.</i> 1995).

*La solución madre de mezcla de aminoácidos para la elaboración del medio mínimo lleva las siguientes concentraciones de aminoácidos.

aa/Base nitrogenada	mg/L	aa/Base nitrogenada	mg/L	aa/Base nitrogenada	mg/L
Adenina	147	L-Tirosina	221	L-Fenilalanina	368
Uracilo		L-Leucina		Ac. L-Glutámico	736
L-Triptófano		L-Isoleucina		Ac. L-Aspártico	
L-Histidina		L-Lisina		L-Valina	
L-Arginina				L-Treonina	
L-Metionina				L-Serina	

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Las técnicas de manipulación de DNA como son la extracción de DNA plasmídico de *E. coli*, restricción y ligación de DNA, electroforesis de DNA en geles de agarosa, técnicas de PCR, etc., se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar (Ausubel *et al.* 1993; Sambrook *et al.* 1989). Las enzimas de restricción, DNA ligasa, T4 DNA polimerasa, fosfatasa alcalina y la enzima Klenow proceden de Boehringer Mannheim. Como patrón de pesos moleculares se empleó el marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco) y el marcador II de Boehringer Mannheim (λ DNA *Hin* dIII).

Para la elución de fragmentos de DNA a partir de los geles de agarosa se utilizó el *kit* GeneClean II (Bio101).

Los análisis de hibridación DNA-DNA y DNA-RNA, se realizaron según los manuales de detección no radiactiva y marcaje de Boehringer Mannheim, en condiciones de alta astringencia (68 °C para DNA y 50 °C para RNA), y transfiriendo a membranas de nylon cargadas positivamente, también proporcionadas por Boehringer Mannheim.

La transformación rutinaria de plásmidos en *E. coli* se realizó por el método de Hanahan (Hanahan 1988) o por electroporación (Dower *et al.* 1988). Las cepas de *C. albicans* se transformaron por la técnica de protoplastos (Herreros *et al.* 1992) o por el método que combina acetato de litio y electroporación (Köhler *et al.* 1997).

Para la interrupción de genes en *C. albicans* se siguió la estrategia descrita por Fonzi e Irwin (Fonzi and Irwin 1993).

Otras técnicas de biología molecular se realizaron siguiendo los protocolos proporcionados por las casas comerciales.

3.1. Plásmidos utilizados.

Tabla 5: Plásmidos originales empleados en este trabajo.

Nombre	Características	Replicación en el huésped*	Origen o fuente
pPECa7	YEpl352 con inserto en <i>Sau</i> 3A de 7,5 kb que contiene <i>ENG1</i> .	Ec/Sc	Dr. Francisco del Rey.
pBluescript®SK(+/-) Phagemid	2,9 kb, derivado de pUC19, origen f1(+), origen f1(-), origen colE1, <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , RCM, <i>bla</i> .	Ec	Stratagene
pCUB6K1	9,47 kb, casete de interrupción <i>hisG-URA3-hisG</i> , <i>kan</i> .	Ec	San José, C., sin publicar.
pGEM®-T	3 kb, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> , para subclonar productos de PCR.	Ec	Promega
pRM1	8,91 kb, <i>bla</i> , <i>ARS2</i> , <i>ARS3</i> , <i>LEU2</i> , <i>URA3</i>	Ec/Sc/Ca	(Pla <i>et al.</i> 1995)
pRM10	7,45 kb, <i>bla</i> , <i>ARS2</i> , <i>ARS3</i> , <i>leu2</i> , <i>URA3</i>	Ec/Sc/Ca	(Pla <i>et al.</i> 1995)
pHER2	3,66 kb, <i>ACT1^{PR}</i> , <i>bla</i>	Ec	(Hernández <i>et al.</i> 1995)
pE1	8,33 kb, <i>bla</i> , casete de interrupción <i>hisG-URA3-hisG</i> insertada en el sitio <i>StyI</i> de <i>XOG1</i> .	Ec	(González Garcés <i>et al.</i> 1997)
pXC-ADH	8,33 kb, <i>bla</i> , <i>URA3</i> , <i>ADH1</i> , <i>ADH2</i>	Ec/Sc	(Cid <i>et al.</i> 1994)

* Ec: *E. coli*, Sc: *S. cerevisiae*, Ca: *C. albicans*.

Tabla 6: Plásmidos obtenidos durante la realización de este trabajo.

Nombre y tamaño	Plásmido de origen	Modificación	Aplicación
pSKSH (2,92 kb)	pBluescript®SK (+/-)	Eliminación de los puntos de corte <i>Sma</i> I y <i>Hin</i> dII de la RMC.	Etapa intermedia en la construcción del plásmido pIR3.
pSKENDO (5,74 kb)	pSKSH	Inserción en <i>Spe</i> I de un fragmento de 2,8 kb del gen <i>ENG1</i> .	Etapa intermedia en la construcción del plásmido pIR3.
pIR3 (8,16 kb)	pSKENDO	Deleción de un fragmento <i>Sal</i> I- <i>Cla</i> I de 1,6 kb del gen <i>ENG1</i> e inserción de la casete de interrupción <i>hisG-URA3-hisG</i> de 4 kb.	Deleción del gen <i>ENG1</i> .
pGEM-ENG1 (6,45 kb)	pGEM®-T	Inserción en el sitio <i>Pst</i> I del gen <i>ENG1</i> .	Etapa intermedia en la construcción del plásmido pIR-ENG1.
pRM10I (6,95 kb)	pRM10	Deleción del fragmento <i>leu2</i> .	Etapa intermedia en la construcción del plásmido pIR-ENG1.

pIR-ENG1 (10,4 kb)	pRM10I	Inserción en el sitio <i>Pst</i> I del gen <i>ENG1</i> .	Reintegración del gen <i>ENG1</i> .
pIR4 (9,2 kb)	pRM1	Sustitución de <i>ARS3</i> por. <i>ACT1^{PR}</i> .	Etapa intermedia en la construcción del plásmido pIR7.
pIR7 (12,67 kb)	pIR4	Inserción del gen <i>ENG1</i> en el sitio <i>Sma</i> I.	Reintegración del gen <i>ENG1</i> bajo el control de <i>ACT1^{PR}</i> .

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un aparato DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) de acuerdo a los protocolos básicos descritos en los manuales de Biología Molecular (Ausubel *et al.* 1993).

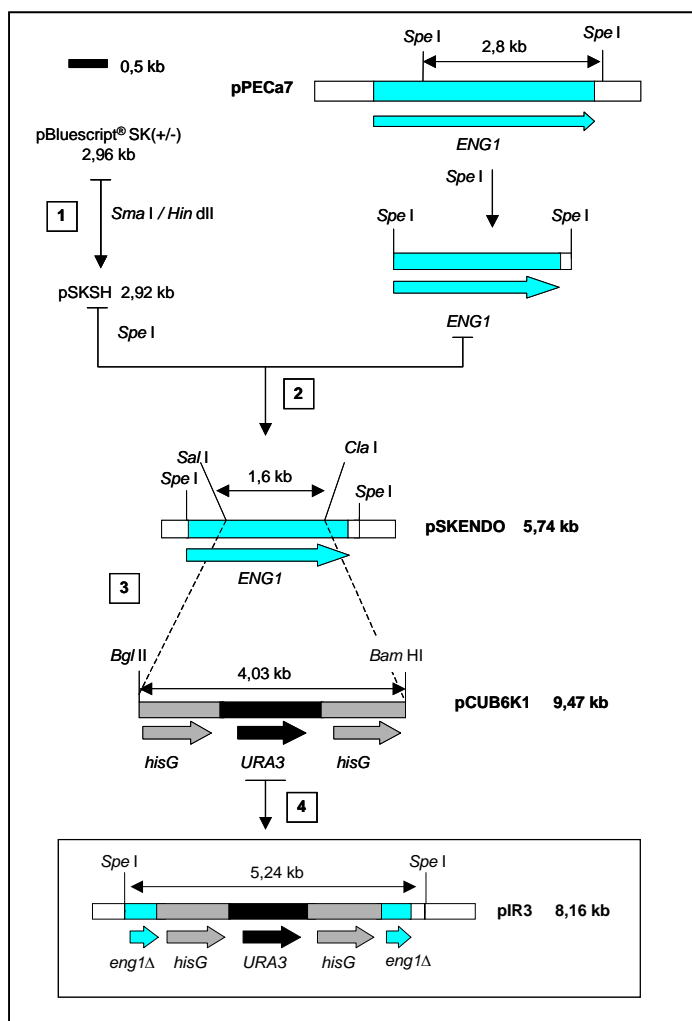
Los desoxinucleótidos provenían de Boehringer Mannheim. Para amplificaciones de comprobación se usó la enzima Taq polimerasa de BioTools, mientras que para amplificaciones en las que se requería máxima fidelidad, se empleó la enzima Taq Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim). Los oligonucleótidos, el tampón de reacción y el cloruro magnésico fueron suministrados por las casas Amersham o Boehringer Mannheim.

3.3. Oligonucleótidos y condiciones de la PCR.

Tabla 7: Oligonucleótidos cebadores usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Aplicación
OHG1 ENDOUF	TTTTTCGCCATCGCAATCAGGC TGCACTGCAGATCGCTATGCTTTTCAA	Comprobación de la interrupción del primer alelo <i>ENG1</i>
OXOG1 OHG2	CGCCAGCTCGATTCTGGTACTGC CGCCAGCTCGATTCTGGTACTGC	Comprobación de la interrupción del primer alelo <i>XOG1</i> . Comprobación de la expulsión del gen <i>URA3</i> en la interrupción del primer alelo <i>XOG1</i>
OURA3	AGATCCAGATATTGAAGGTAAAGG	Comprobación de la interrupción del primer alelo <i>XOG1</i> Comprobación de la expulsión del gen <i>URA3</i> en la interrupción del primer alelo <i>XOG1</i> .
UP RP	GTAACGACGGCCAGT CACAGGAAACAGCTATGAC	Secuenciación de los extremos 5' y 3' de <i>ENG1</i> , hasta los sitios de restricción <i>Hin</i> dIII.
ENDOLW	GCACTGCAGCTAACTAGCATTGAGAGC	Amplificación de <i>ENG1</i> con puntos de corte <i>Pst</i> I. Comprobación de la integración de <i>ENG1</i> en el genoma.
INT.UPPER INT.LOWER	GGTCTGATTCTCAACTTCTAC CCAATAAGTCCGTATGGCAAT	Comprobación de la reintegración de <i>ENG1</i> .

3.4. Construcción del plásmido pIR3.

**Figura 11: Construcción del plásmido pIR3.**

1) El plásmido pBluescript®SK(+/-) fue digerido con las enzimas de restricción *Sma* I y *Hin* dII para eliminar los puntos de corte *Sal* I y *Cla* I de la región de clonación múltiple. 2) Tras digestión del plásmido obtenido, pSKSH, con la enzima *Spe* I, se subclonó el fragmento *Spe* I-*Spe* I de *CaENG1* de 2,8 kb, procedente del plásmido pPECa7. 3) En este nuevo plásmido, pSKENDO, se eliminó el fragmento *Sal* I-*Cla* I de 1,6 kb de *CaENG1* tras digestión con las correspondientes enzimas y tratamiento con Klenow para obtener extremos romos. A continuación se obtuvo la casete de interrupción *hisG-URA3-hisG* de 4,03 kb procedente del plásmido pCUB6K1, cortando con las enzimas *Bgl* II y *Bam* HI y tratando posteriormente con Klenow, con la finalidad de obtener extremos romos. 4) El plásmido final procedente de la subclonación de la casete *hisG-URA3-hisG*

en pSKENDO fue pIR3, que contiene la construcción de 5,24 kb empleada para interrumpir el gen *CaENG1*.

3.5. Construcción empleada en la delección de *CaENG2*.

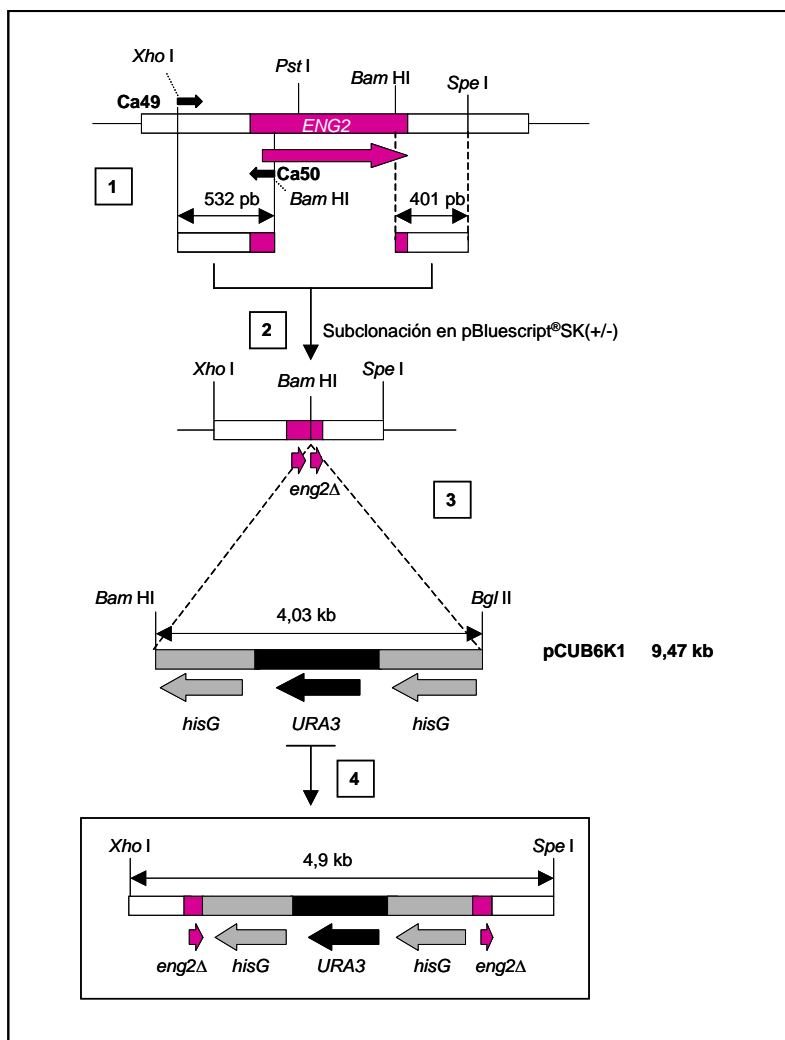


Figura 12: Construcción empleada en la delección de *ENG2*.

1) Amplificación mediante los oligonucleótidos Ca49 y Ca50 de un fragmento de 532 pb que comprende parte de la región 5' del gen *ENG2* y el inicio del marco abierto de lectura del mismo. El oligonucleótido Ca49 lleva la secuencia de corte de la enzima de restricción *Xho*I. El oligonucleótido Ca50 incluye la secuencia de corte de la enzima de restricción *Bam*HI inmediatamente después del triplete de inicio ATG. 2) Subclonación del fragmento amplificado en el vector pBluescript® SK (+/-) en el que previamente se ha

introducido un fragmento de 401 pb que incluye la región final del gen *ENG2*, desde el último punto de restricción *Bam* HI, y parte de la región 3' del mismo hasta el sitio de restricción *Spe* I. 3) El plásmido resultante fue digerido con la enzima *Bam* HI para subclonar la casete de interrupción *hisG-URA3-hisG* de 4,03 kb. 4) El plásmido final obtenido contiene la construcción de 4,9 kb empleada en la delección del gen *ENG2*.

3.6. Construcción del plásmido pIR-ENG1.

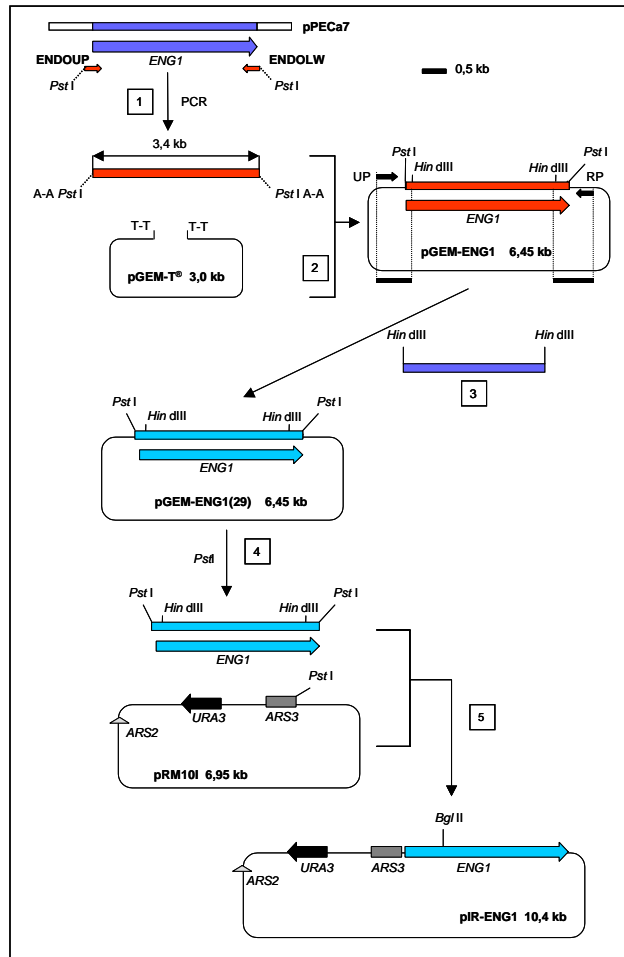


Figura 13: Construcción del plásmido pIR-ENG1.

1) Amplificación del marco abierto de lectura del gen *ENG1* con los oligonucleótidos ENDOUP y ENDOLW, que introducen en ambos extremos una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Pst* I. 2) Ligación de este fragmento amplificado con el vector pGEM-T, originando el plásmido pGEM-ENG1 de 6,45 kb y posterior secuenciación de dos fragmentos del ORF con los oligonucleótidos UP (híbrida en la cadena + del vector) y RP (híbrida en la cadena – del vector) hasta las secuencias

de reconocimiento para la enzima de restricción *Hin* dIII. 3) Eliminación del fragmento *Hin* dIII-*Hin* dIII del gen *ENG1* del plásmido pGEM-ENG1(29) y sustitución por el mismo fragmento, de secuencia correcta, procedente del plásmido pPECa7. 4) Subclonación del gen *ENG1*, procedente de la digestión del plásmido pGEM-ENG1(29) con la enzima de restricción *Pst* I, en el sitio de restricción homónimo del plásmido pRM10I. 5) El plásmido final obtenido fue pIR-ENG1, de 10,4 kb, que lleva la construcción para integrar *ENG1* en su *locus*.

3.7. Construcción del plásmido pIR7.

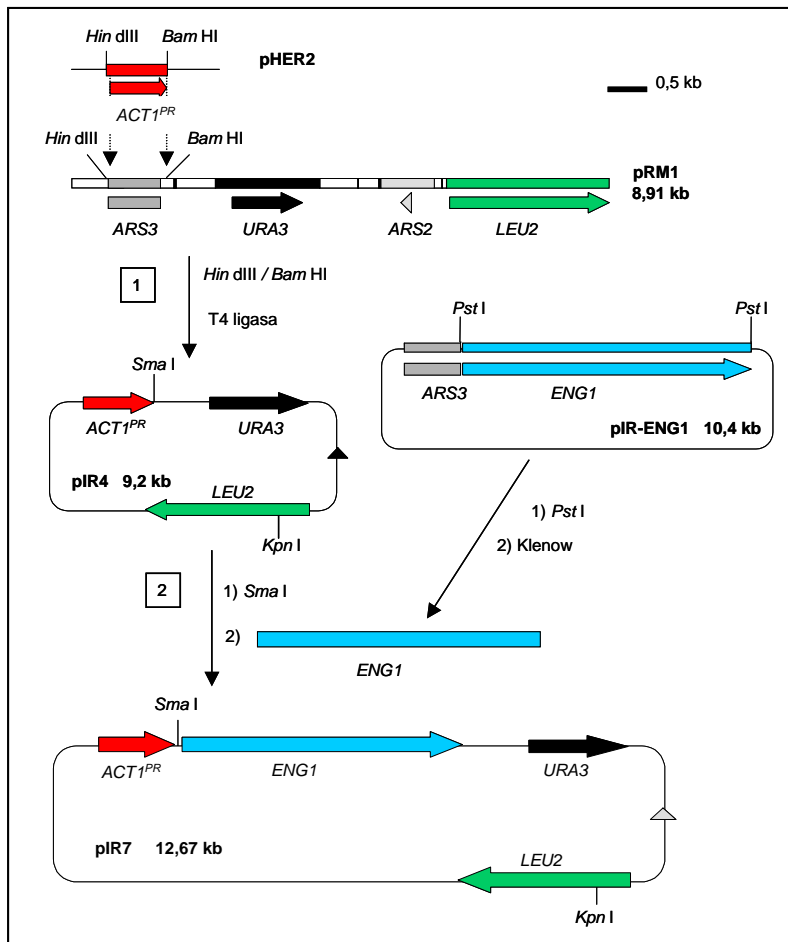


Figura 14: Construcción del plásmido pIR7.

1) Sustitución en el plásmido pRM1 de la secuencia autónoma de replicación ARS3 por el promotor de actina, *ACT1^{PR}*, usando los puntos de corte *Hin* dIII y *Bam* HI, obteniendo el plásmido pIR4 de 9,2 kb. 2) Subclonación del gen *ENG1*, aislado del plásmido pIR-ENG1 mediante la enzima de restricción *Pst* I, en el plásmido pIR4, utilizando el punto de corte *Sma* I. El plásmido obtenido es pIR7, de 12,67 kb, que ha sido empleado para reintegrar el gen *ENG1* en la cepa $\Delta eng1\ xog1$.

4. ENSAYOS DE FILAMENTACIÓN DE *C. albicans*.**4.1. Medio líquido.**

Se inoculó un número de células de *C. albicans* entre 5×10^5 y 1×10^6 cél.mL⁻¹, en 2 mL de medio inductor de la filamentación. Los cultivos se incubaron a 37 °C y la morfología celular se observó a tiempo cero y a las 2, 5 y 24 horas del inicio del ensayo. El medio inductor de la filamentación fue suero de ternera fetal (STF) usado a diferentes concentraciones en medio YED: 100 %, 20 %, 5 % y 1,25 % (v/v).

4.2. Medio sólido.

Unas 50 unidades formadoras de colonias fueron sembradas en MM, MM suplementado con 10 % (v/v) de STF, YPD, SLAD, Spider y medio de Lee a pH=7. Se analizaron las colonias obtenidas en los diferentes medios sólidos tras siete días de incubación a 37 °C.

4.3. Invasividad en placa.

Después de observar la morfología colonial de *C. albicans*, se lavaron las colonias suavemente con una corriente de agua de intensidad homogénea para observar la capacidad de invasividad de las mismas por penetración en el agar.

5. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LA TOXINA KILLER K-500.

La cepa de *C. albicans* cuya sensibilidad se quería ensayar, era crecida durante una noche a 37 °C. Se inoculó a una concentración de 5×10^4 cels mL⁻¹ en medio MBA atemperado a 45 °C, vertiéndose a continuación en placas Petri. Una vez solidificadas las placas, se colocaron cuatro gotas por placa de 10 µL de la cepa *killer* de *Williopsis mrakii*, previamente crecida en medio YPD a 25 °C durante una noche. Las placas se incubaron a 25 °C durante 2-3 días, transcurridos los cuales se midió el halo de inhibición producido por la cepa *killer* alrededor de cada gota (Hodgson *et al.* 1995).

6. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A ZIMOLIASA.

Este ensayo se realizó observando el descenso de la densidad óptica (mediante turbidimetría) de una suspensión de células de *C. albicans* en presencia de zimoliasa 20T a una concentración de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, según el protocolo descrito por Ovalle y colaboradores (Ovalle *et al.* 1998) Cada ensayo se realizó por triplicado en placas multipocillo usando el analizador iEMS (*Integrated EIA Management System*), que permite la lectura de densidad óptica a la longitud de onda deseada, ofreciendo un sistema de sensibilidad, especificidad y control de temperatura. Está equipado con un sistema de agitación orbital que asegura la homogeneidad de la muestra en el momento de la medida. Se consideró el resultado más representativo de cada ensayo.

Para este ensayo se crecía la cepa cuya sensibilidad se quería medir a 37°C durante varias horas. Se recogían 5 mL del cultivo en fase exponencial y se lavaban 2 veces con Tris.HCl 10 mM a pH 5. Tras contar el número de células en una cámara de Neubauer, se ajustaba la concentración a $1,5 \times 10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$ en la solución de Tris.HCl, añadiendo 200 μL de esta suspensión en cada pocillo de la placa dónde se realizó el experimento.

7. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A DISTINTOS AGENTES QUE INTERFIEREN CON EL METABOLISMO CELULAR MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA CMI.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) a distintos antifúngicos o sustancias que afectan a la actividad celular se determinó mediante el método de microdilución (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1992). Se inocularon varias placas multipocillo con concentraciones decrecientes de cada agente a una concentración de $1 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$ de cada cepa cuya sensibilidad se quería ensayar, y se incubaron a 30°C y 37°C durante 48 h., realizándose dos lecturas visuales a las 24 y 48 h. En el caso del antifúngico Nikomicina Z, se realizó también una incubación a 42°C y otra observación visual a los 4 días del inicio del ensayo. Cada ensayo se realizó por triplicado utilizándose los datos más representativos.

En la siguiente tabla se enumeran los antifúngicos utilizados así como su mecanismo de acción e intervalo de concentraciones ensayadas.

Tabla 8: Antifúngicos ensayados.

Agente	Mecanismo de acción	Grupo	Intervalo concentraciones ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ciclosporina	Inhibidor de la calcineurina.		300-0,58
Anfotericina B	Interacciona con el ergosterol de la membrana plasmática.	Polieno	30-0,058
Tricodermol	Inhibidor de la síntesis de proteínas.		20-0,039

Fluconazol	Inhibidor de la síntesis de ergosterol.	Azoles	100-0,18
Itraconazol	Inhibidor de la síntesis de ergosterol.	Azoles	100-0,18
5-fluorocitosina	Inhibidor de la síntesis de ác. nucleicos.	Análogo de nucleósido	3-0,0058
Higromicina B	Inhibe la síntesis proteica.	Aminoglucósido	500-0,97
Ortovanadato sódico	Inhibidor de las ATPasas tipo P.	Tóxico celular	200-0,39
Pneumocandina	Inhibidor de la síntesis de β -1,3-glucano.	Equinocandinas	25-0,04
Nikomicina Z	Inhibidor de la síntesis de quitina.	Nikomicinas	250-0,48

8. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD EN PLACA.

Las cepas a ensayar fueron crecidas durante una noche. Se midió la D.O. para determinar la concentración de células en el medio. Se igualó el número de células para cada cepa, y se hicieron suspensiones seriadas (diluciones 1:10) de manera que en 3 μ L de suspensión, el número de células fuera de 10^2 hasta 10^5 . Estas gotas se sembraron en las placas de YPD suplementadas con los diferentes compuestos a ensayar, junto con una placa control del crecimiento, de medio YPD. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h., transcurridas las cuales se observaron los resultados. Cada ensayo se realizaba por duplicado varias veces.

En la siguiente tabla se detallan los compuestos empleados y las concentraciones utilizadas.

Tabla 9: Compuestos utilizados en los ensayos de sensibilidad en placa.

Compuesto	Concentraciones
Blanco de calcoflúor	150-25 (μ g.mL ⁻¹)
Rojo Congo	250-75 (μ g.mL ⁻¹)
Ortovanadato sódico	10-0,5 (mM)
Cristal violeta	0,2-0,025 (μ g.mL ⁻¹)
Higromicina B	250-50 (μ g.mL ⁻¹)

SDS	0,2-0,01 (%)
-----	--------------

9. TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Células crecidas en MM suplementado con todos los aminoácidos y requerimientos nutricionales excepto uridina, se recogían en fase exponencial de crecimiento, y se lavaban dos veces con PBS estéril. Se tomaban entre 1×10^6 y 5×10^6 células de cada cepa que se quería ensayar, que eran resuspendidas en 0,5 mL de PBS e incubadas durante 30 minutos a 37 °C con el fluorocromo correspondiente a la concentración adecuada.

La fluorescencia emitida por las células tras la incubación se detectaba usando un citómetro de flujo Bio-Rad Bryte HS (para el calcoflúor) o un citómetro Becton Dickinson FACScan (para el reto de los fluorocromos).

Tabla 10: Fluorocromos utilizados en este trabajo.

Fluorocromo	Concentración final	Parámetro biológico o funcional	λ excitación/ λ emisión (nm)
Ioduro de propidio (IP)	0,5 mg.mL ⁻¹	Viabilidad celular (de la Fuente <i>et al.</i> 1992)	488/630
Blanco de calcoflúor	10 µg.mL ⁻¹	Contenido en quitina de la pared celular (Pringle 1991).	340/420
Isocianato de fluoresceína (FITC)	1 µg.mL ⁻¹	Contenido en proteínas totales (Giannis <i>et al.</i> 1994).	488/530
Rojo Nilo (RN)	0,002 µg.mL ⁻¹	Contenido en lípidos totales (Shapiro 1993).	488/530-600
Rodamina 123 (Rh 123)	1 µg.mL ⁻¹	Potencial de membrana mitocondrial (Shapiro 1994).	488/530
Dihidroclofluoresceína-diacetato (DCFH-DA)	10 µM	Actividad peroxidasa (Harvath and Terle 1994).	488/530

10. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXOGLUCANASA.

Las cepas a ensayar eran sembradas en una placa de MM e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Una vez crecidas las colonias se añadía una sobrecapa de una mezcla fundida que contenía agarosa al 1 % (p/v) y MUG (4 metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido) al 0,03 % en tampón acetato potásico 50 mM a pH=5.3. Las placas se incubaron a 37 °C desde 30 minutos a varias horas hasta visualizar el halo que aparecía alrededor de las colonias al irradiar con luz ultravioleta, como consecuencia de la hidrólisis del MUG por la actividad exoglucanasa (González Garcés *et al.* 1997).

11. ENSAYO DE VIRULENCIA EN UN MODELO MURINO.

Para la infección de los ratones, tanto la cepa parental como las cepas mutantes se crecieron en placas de YED a 30 °C durante 24 h. A continuación las células eran recogidas y lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y diluidas a la densidad deseada en el mismo tampón, para inyectar 0,5 mL en la vena lateral de la cola del ratón. Se inyectaron tres dosis diferentes de células de *C. albicans*: 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 cél. (Díez-Orejas *et al.* 1999; Díez-Orejas *et al.* 1997).

Se emplearon dos estirpes de ratón, BALB/c y DBA/2, machos y hembras, de 12 a 16 semanas de edad y con un peso cercano a 18 g. Todos los estudios animales se realizaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. El manejo experimental de los ratones se llevó a cabo siguiendo las normas éticas dictadas por la Unión Europea.

Para cuantificar la patogenicidad de las cepas, se midió el porcentaje de supervivencia de los ratones (10 por grupo) a lo largo de la infección, así como la capacidad de colonización de estas cepas, estimada a través del alojamiento de las levaduras en el riñón y cerebro del ratón a diferentes tiempos de infección. Para esto, los riñones y cerebros de ratones individuales (5 por grupo) fueron extraídos asépticamente y depositados en un tubo con 5 mL y 3 mL de PBS respectivamente, para ser homogeneizados a continuación. El número de levaduras viables en los especímenes fue determinado por dilución en placas de YED con 10 mg.L^{-1} de cloranfenicol. El número de colonias se cuantificó tras 24-48 horas de incubación a 37 °C (Romani *et al.* 1991). Los resultados se expresaron como logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias (log UFC) por ratón.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Uno de los principales objetivos de nuestro laboratorio es el hallazgo y caracterización de nuevas dianas para sustancias antifúngicas, con el fin de controlar las infecciones causadas por este tipo de microorganismos. Por ello, y desde hace numerosos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de la pared celular de *Candida albicans*, el principal patógeno fúngico.

Las glucanasas constituyen la principal maquinaria hidrolítica de la pared celular de levaduras y hongos. Trabajos previos realizados en nuestro departamento habían puesto de manifiesto la existencia de una enzima responsable de la actividad exo- β -1,3-glucanasa mayoritaria, detectada en el medio de cultivo de extractos celulares. La delección posterior del gen *XOG1*, responsable de dicha actividad, había permitido observar la importancia del mismo en la organización de la pared celular de *C. albicans*. Este hecho, junto al conocimiento de dos nuevas actividades endohidrolíticas del glucano en *S. cerevisiae*, impulsaron la búsqueda de otros genes de *C. albicans* responsables de la actividad glucanásica residual observada en las cepas carentes del gen *XOG1*. Motivados por la importancia que proteínas de este tipo pudieran tener como posibles dianas antifúngicas, comenzó un trabajo de colaboración en 1998 entre nuestro departamento y el departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, con amplia experiencia en el estudio de glucanasas de diferentes hongos y levaduras.

La clonación del gen *CaENG1* permitió abordar el primer objetivo de esta Tesis Doctoral: su **delección** en *C. albicans* con el fin de establecer la función del mismo. Posteriormente, se pudieron abordar los siguientes objetivos, la **caracterización fenotípica** del mutante obtenido y el **estudio de la virulencia** del mismo en animales de experimentación. La identificación y la clonación del gen *CaENG2*, a su vez, hizo posible emprender un trabajo extenso y metódico de **obtención de mutantes delecionados en uno, dos o tres genes de glucanasas**. Los siguientes objetivos derivados de éste han sido el **estudio fenotípico** de los diversos mutantes obtenidos y el **estudio de la virulencia** de los mismos en un modelo murino de infección sistémica.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *CaENG1*.

Las secuencias aminoacídicas de las endo- β -1,3-glucanasas Eng1p y Eng2p de *S. cerevisiae* y Eng2p de *S. pombe* presentan varias regiones con una elevada similitud (figura 15). Teniendo en cuenta dichas regiones, se diseñaron unos oligonucleótidos degenerados que permitieron obtener una sonda por PCR para rastrear una genoteca de DNA genómico de *C. albicans*. Mediante un ensayo de tipo *colony blot* se detectó un fragmento de DNA que, tras su secuenciación, resultó tener una elevada similitud con el gen *ENG1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Por este motivo, fue designado como *CaENG1* (Dr. Pedro Felipe Esteban. Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca). A partir de este momento y para simplificar, se hará referencia al gen *CaENG1* como *ENG1*. Sólo en caso de una posible confusión con sus homólogos en otras levaduras se usará *CaENG1*.

```

Sc1 VTNFKLQG-VSDGSTATYEFSTYTTQGESASGSTMIFALPHHESSFSDIMQDYTG IQLAS 713
Sc2 PVYCDLSGQTVDEHFTNYRFNYTVAGYSQSGTTLMYALPHHKAAFTPEMQEREIASSLDS 381
Sp2 TTSISLSA-QVSGTTGEYWFRFATAGYTN-LNPLMFALPHMQSFGSDTQAYKTGLGLAS 310
. . * . . . * * : . * : . : : * * * * : * * . * *

Sc1 TTKGVMNGYLTTSLQFSTS-LNRQISWLPWSSQLGSLNLEYSKEQLQLLAEVANSELQVS 772
Sc2 TVKGLMTGYLTNSFDMQVQ-VPQELGFEPVALSLN-KKADYSQEKLSKIREAAVQEVQLS 439
Sp2 TTMGIMFAYATKTWHLIEKNLPTQVGFLPIPWNGG--SNTYSPTALAAIRAACATDINFD 368
* . * : * . * . : . : : * . . . * * * : . . : : . .

Sc1 ISESISGLN-TYYLGKVIDKYSYILLTVSEIIQDEASTKSTLENIKSAFDILLQNEQTYP 831
Sc2 DPQQESNIDSMYFSGKILAKYAWILYVTHYILHDENLTKELLSKLTIAMERFISNQVLP 499
Sp2 VVN-ASNLDSMYTSKGIVAMYAQVCLVASRILGDSTLTNTGLTKLKQAMARFTTNTQMYP 427
: * . : : * * : : * : : . * . * : * : : * : : * * *

I oligo 1 →
Sc1 LIYDTKFNGLVSSGDWGSTSTQYDFGNTYYNDHHFHYGYIIHAAAVIGYVDSKLN---G 887
Sc2 LNYDVSWKGIISG-----SSSQDFGNSYYNDHHFHYSHVITAAIISLVDSDLSGVTNN 554
Sp2 LVYDTTYKGIISTAG--YSSPLADYGNTYYNDHHFWGYHIYACAVIGLLD-----P 477
* * . . : : : : : . * . * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

← oligo 2 II
Sc1 TWAA-DNKDWVNSLVRDVANPSEKDEYFAQSRMFDWFNGHSWAAGLYENGNGKNEESSE 946
Sc2 SWLE-NNRDWVECLIRDYSGVDNDPPYFPQFRSFDWFNGHSWAKGLFPSGDGKDEESTSE 613
Sp2 SWLVNDNIRYVNALRDSANPSESPTYFAMFRNFDWFVGHSWATGIFESGDGKDEESTSE 537
: * : * : : . * : : . . : . * * . * * * * * * * : : . * : : * : : *

Sc1 DYNFAYAMKLWGATIGDQSMELRGDLNISIMKDAMNDYFYYQNDNTVEPEEIIIGNKVSGI 1006
Sc2 DVNSCYAIKLWGLVTGNSKLTDIANLQLGIMRNVFQSYFLYESNNTVQPKFIGNKVSGI 673
Sp2 DFNFLYATKLWGMVRNDTVLINRANLMLAVLKNLSLNTYIYMTPTTSVQPSQILGNYVTGI 597
* * * * * . . : : . : * : : : : : : * : : * : : : : * * *

```

Figura 15: Bloques de homología utilizados para el diseño de los oligonucleótidos degenerados oligo1 y oligo2.

Alineamiento de parte de las secuencias aminoacídicas de las proteínas ScEng1p (Sc1), ScEng2p (Sc2) y *eng2+* (Sp2) que permite observar los bloques de homología I y II (sombreados). A partir de estas regiones homólogas se han diseñado los oligonucleótidos degenerados oligo1 y oligo2 que han permitido, mediante PCR, obtener una sonda de DNA para rastrear la genoteca de *C. albicans*.

El análisis de la secuencia de nucleótidos puso de manifiesto una única fase de lectura abierta de 3435 pb, que codifica un polipéptido de 1145 aminoácidos. En la figura 16 se muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 4858 pb que contiene el gen *ENG1* y su traducción a aminoácidos, junto con las regiones 5' y 3' adyacentes.

En dicha secuencia, se pueden observar también las señales reguladoras de transcripción características de los genes de levadura. El subprograma EUKPROB del programa PC/GENE, que permite detectar posibles elementos promotores de genes eucariotas, que determinan el sitio y eficiencia de la transcripción (Bucher 1990), ha permitido señalar una posible “caja TATA”, situada en la posición 618, 93 pb antes del supuesto triplete de inicio de la traducción. Respecto a los elementos que intervienen en el punto de inicio de la transcripción, se han localizado dos posibles “señales cap”, zonas con la secuencia CA seguida de varias pirimidinas, que en este caso se sitúan en las posiciones 651 y 641, a 30 pb y 20 pb respectivamente, de la caja TATA señalada.

El codon CUG que se traduce por leucina según el código genético universal, es traducido por serina en el caso de *C. cylindracea* (Yokogawa *et al.* 1992), *C. albicans* y otras especies del mismo género (Ohama *et al.* 1993) y más recientemente se ha descrito también en *C. maltosa* (Sugiyama *et al.* 1995). Respecto al código genético usado en la traducción del gen *ENG1* a proteína, hay que destacar la presencia del codon CTG en las posiciones 711, 945, 963 y 2778.

```

GTTAACAATGTCATTAACAATTGAGATGAAAAGTAACCTTCCAAAAGGCATTGCTGGTTGGAGGAAGACTAA 72
AAAAACAAAATAATTATTCAATAATAATAATGTGTCACAAAATTATGTCTATAATTTTTCTCTCTCTCT 144
CTTCAATTTTATTGTTCAACTGATTTTCGCAACAATAAATAAAAAACCTCACACTTCATTCTTCTTACTTACT 216
GGGCGGACAGAAAAAAGAAAAAGAAAAAATACCACCAGACTGGTTGTTAAACGATAAACAATCGACTT 288
AATTGTAATTAACAATACCATTCCAAATCGTTTCAGCATTATAGTTTATAGGTTGTGTAACACAAATAATT 360
ATATTGCTAGATTATCTTAAACAATATACCAAGTTATACAATGAAATACAAAAAAGCAAAAACTTTT 432
CCGGAATTAGAAGATCCAGCATCAGATTGAGCGTGTTCGTATTGTTTTTCGTGAAATTTTGTGTCAATATCT 504
AACGTTAATTATTATGATTCTGTTTTTTTACTTGGCTCCTTCGGTGCTTGCAAAACAAAATGGGTGGGTT 576
TTCTTTTCATAAACAGTTCTCATGTCTATTCAATTGCGTTCCATATAAATACTGGTCTGATTCTCAACTTCTA 648
CCATTCAATTTATTGAACAAGATTTATCATTCTAGATCATAGTTATACATTAATATATCGCTATGCTTTTCA 720
                                     M L F
AATCCGTATTACTTAGCACACTAATAGCCGTTCAAGCTTTGGCAGAGAACCCTGGCTCATCAAGAAATCGTTA 792
K S V L L S T L I A V Q A L A E N S A H Q E I V

```

CTGTTACTAAAACTACACATATAAGCAACCCTTGCTTAGAAAACTATGCTAAAAAGTTATTACCAAACAACC 864
T V T K T T H I S N P C L E N Y A K K L L P N N

CAACTGGATTAACTACTGGTATTCCTATAGTGATAGTCTACGCACCACAACAACCAGACAACCAAGTAAAGC 936
P T G L T T G I P I V I V Y A P Q Q P D N Q V K

AATCAGAACTGCTACAACCAACACAACCTGTCAAAAAGCACAACAACAACAATAAAGGGTCATCTGTAC 1008
Q S E S L Q P T Q S S K A Q Q Q Q Q I Q G S S V

CAGCTTCCATACATGATACCCCAACTCCAAGTATGATATAAAATTACTGTACAGAGCACTACCATATGCA 1080
P A S I H D T P T P T D H T K I T V T S T T I C

ACCAAAAGGTGTGCACTGTAAAAACTTTTTCCACCATAATTTCTCACAGTGAGTCTCCTACTACTACTACTA 1152
N Q K V C T V K T F S T I I S H S E S P T T T T

CAACCAACAAAATGAAGAAAAGTCTATTGCTGATACAAAGTCTTTCACTCACAAAGCCCTCCCCAGCTCCA 1224
T T K Q N E E K S I A D T K S F T H K A L P S S

ATGGTGCTGTGACTTTGAGACAACAGTGTGAAAAGTGTGCACTAACTACCACCTCAACAGTATTTAGTGCTA 1296
N G A V T L K T T S V K T A L T T T S T V F S A

CATCTTTACCGTCAACGACTTATACACCCCTCCACTTCCGTTTCCTTAGTCTCCACAACAAAGAAAAATCCAG 1368
T S L P S T T Y T P S T S V S L V S T T K K N P

TGAGCTCACAGTCAGTTGTTAGCACAACTAAAACATTTTCCATTAAACATCATTAAATCACAGATGCAGTTA 1440
V S S Q S V V S T T K T I S I N T S L I T D A V

CAATTACAAAGGAAGCAACAACCTTTGCCAAATTCTAAACACTCTTCCACTTTTACCAATGGGTCTATTTCCCT 1512
T I T K E A T T L P N S K H S S T F T N G S I S

TTATATCGACTAGTGCTAATAAGGTTAAAAGCACTGTGCATCCGATATATCAAATAATTACAGAAATAGAT 1584
F I S T S A N K V K S T V T S D I S N N S Q N R

CTAGCTTGAGTCTTACTTCAACTATAGATCAATTAGCTTCCATTACAACTCAACTCTTACAACAATTACCA 1656
S S L S L T S T I D Q L A S I T N S T L T T I T

AGCCTACTTCGTTGGTGCCAGATTTTCAAGTACACAACTCATCGCGGGTGTCAAGTACTATGAGAAATCTTT 1728
K P T S L V P D F S Y T N S S R V S S T M R N S

CAGAAGAATCCTCTATGGTACTTGAAGAAATCGAGTTCCAAATTGTTATCTAGCACTTCATCTTTAAATTCCT 1800
S E E S S M V L E K S S S K L L S S T S S L N S

CATCAATCGCATCTACTACAGAGTCTTCTGAATTAGCATCTGCAACAACATCTGATAGCTCACTTAGCCACA 1872
S S I A S T T E S S E L A S A T T S D S S L S H

GTTCTTCCAGTTCTGTTGAAGTCTAGCTCCAGTTTAAAGCTCGGAAGCCGACTCCAGTTCAAGTTCAGAAAGTG 1944
S S S S S V E L S S S L S S E A D S S S S S E S

TTGAAACAGGGTCTAGTGACGAAAGTGTGCTAGCAATTACTCAGGTGACTTGTTCAAAGCAATAGATACCAACG 2016
V E T G S S D E T A S N Y S G D L F K A I D T N

CTCCACCAACAGTTTTCGCAAGAAGTGAAATTCCTTTAAACAATTCCTGCTGGTGTGACACAACAACGGTAAAC 2088
A P P T V F A R S E I P L T I P A G V D N N G K

CAATTGGAACCAACAAATTCCTATACCAATTTATTACTTGGCAATCAAGATTTTCATGGTGTATCCATTGCCAT 2160
P I G T N K F Y T N L L L G N Q D F M V Y P L P

ACGGACTTTATTGGAGTAAACAAGTTATTATGGATTTGCTGTTCAACATAATAATGTATCCGACAGAGTTT 2232
Y G L Y W S K T S Y Y G F A V Q H N N V S D R V

TTGGATCAATAAACTAATAATAAGGGAGTTGCTTCTTATTACTTTAACCCAACTAACAATGCTGAATTGA 2304
F G S I N T N N K G V A S Y Y F N P T N N A E L

Resultados

TATTTTCTGCTACATCATTTTCCAAAGATTCAATGCATATGAAAGTGTCTCAAATGGCTGAATTGTCTGCCT 2367
I F S A T S F S K D S M H M K V S Q M A E L S A

TGGTTACATTGTCAAGTCTCTCCAATGATGAGTCTAATTATTTGGATATTCCTTTAGTTCAAGGTATGGGTT 2448
L V T L S S S S N D E S N Y L D I P L V Q G M G

TTGTTACCGGTATTATAACGGGAATTGACTCCCTTGTTGAATTCGTTGTTTCGGAGTTAAAGATTTATCTC 2520
F V T G I Y N G N L T P L L N S L F G V K D L S

TTGAGACTTCTGATGCTTTATTATCCAATGTTTTGAAATATCGTGTACATTATTGAATAATGTTCAATGGT 2592
L E T S D A L L S N V L K Y R A T L L N N V Q W

TGATTTACGTTACATTACCAGATAAAGATACTGACTTTAAATTAGAGGTCGAAGATTTCTACAACCTAAAGG 2664
L I Y V T L P D K D T D F K L E V E D F Y N L K

GATCCAAACCAGTTGATGGATTAATTATTCAAGTCGAATTGCTCCTGAAGATAATGATAATGATAAGTACT 2736
G S K P V D G L I I Q V A I A P E D N D N D K Y

ATGATGCCGCTGCTGGTATGTACGTTACCGGTGCCACTGTTCTGGGAAGTGATCCCAGGGCACAGCTGCTA 2808
Y D A A A G M Y V T G A T V **S** G S V S Q G T A A

GTTATAAGTTCAGCTACACCACTGCCGGTAAATCTTCATCCAATAACCCAATTGTCTTTGCTTTACCACATC 2880
S Y K F S Y T T A G K S S S N N P I V F A L P H

ATATGGATTCAATTAACCGGTTCTGCTCTTGATGCATTGACTGGTATTACGGTTACATCTACTACTAAAGGTG 2952
H M D S L T G S A L D A L T G I T V T S T T K G

AAATGACCGGTTTTTTAACAAATGAATTGGAATTCAGTGAAACAATTAATCAAGACGTGGAATTCCTTGCCAT 3024
E M T G F L T N E L E F S E T I N Q D V E F L P

GGACAGAAAATATGACAGGTAGTTTGACCTACACTAAGGATCAATTAGAATTATTAGCTAGTGTGCTAACA 3096
W T E N M T G S L T Y T K D Q L E L L A S A A N

AAGAATTGGCAGCAGATATTGCTGCAACAGTGAAGAATATGAACCTAATTATTTTTTCAGGAAAAGTTCTTG 3168
K E L A A D I A A T V K N M N S N Y F S G K V L

ACAAGTATGCTCAAATATTATTGGTGGTTAGTGAATCATACAGGATGAAGAAGTTACCAAAGATGCCTTAA 3240
D K Y A Q I L L V V S E I I Q D E E V T K D A L

ACGCAATGAAGGATGCCTTTAAAGTTTTTCACGCAGAACAACAATACTATCCATTGATGTATGATACTAAAT 3312
N A M K D A F K V F T Q N K Q Y Y P L M Y D T K

TTGGTGGAGTAACGTCAACATCTGCTCAAGACGGCGATCCAAACGCTGATTTTGGCTCTGCATATTATAACG 3384
F G G V T S T S A Q D G D P N A D F G S A Y Y N

ACCACGATTTCCATTATGGTTACTTTTATTCACGCAGCAGCCATAGTTGGTTACGTCGATAAGAAATTAGGTG 3456
D H D F H Y G Y F I H A A A I V G Y V D K K L G

GTACTTGGGCTCAAAGTAATAAAGACTGGGTGAACCTCTTTAGTGAGAGACGCTTCGAATCCTTCTGCCGATG 3528
G T W A Q S N K D W V N S L V R D A S N P S A D

ATACTTATTTCCCTGTTTCAAGAATGTTTGACTGGTTCTCTGGTCATTTCATGGGCAACTGGTTTGTTCGTCA 3600
D T Y F P V S R M F D W F S G H S W A T G L F V

CTTACAAGAACATTGAATCAAGTCCGAATCATTACATTTTGCTGCTGCTATAAAATTATGGGGTAAAGTAG 3672
T Y K N I E S S S E S L H F A A A I K L W G K V

TCGGTGATCAATCGATGGAAGCAAGAGGTGGTTTGATGATTTCATTATGGCACGTTCTTTTAAACATGTATT 3744
V G D Q S M E A R G G L M I S I M A R S F N M Y

TCTACTATAAATCAGATAATACTGTGGAACCAAAACAAATTTTACCAAACAAAGTCAGTGGTATATTTTTCG 3816
F Y Y K S D N T V E P K Q I L P N K V S G I F F

```

AGAATAAAGTTGATTACACTACATTCTTTGGAACACCAGCTGATCATCCAGAATATGTCCATGGTATCCATA 3888
E N K V D Y T T F F G T P A D H P E Y V H G I H

TGCTTCCAATTACACCTTCCTCATCGTTGGTTAGAAAGACTTCTTACGTTCAAGAAGAATGGAAAGATCAAA 3960
M L P I T P S S S L V R K T S Y V Q E E W K D Q

TTGCTGGTTTTATTGATAATGTTGATAGTGGCTGGACTGGTATTTGAGATTAAACCAAGCTTATTGATC 4032
I A G F I D N V D S G W T G I L R L N Q A L F D

CTAAATCATCATATGAATTTTTTGCATCAAATAACTGGGATGACAAGTGGTTAGATAATGGTCAAAGTAGAA 4104
P K S S Y E F F A S N N W D D K W L D N G Q S R

CTTGGAGTTTGGCTTTTGTCTGCTGGTCTCTCAATGCTAGTTAGCTTATGTACTATAATTCTTATTTTCGTGA 4176
T W S L A F A A G A L N A S -

AAGATTTCACTTTCATTTAATTTTGTTTTTTAATAATTATTTTATCAGGTTAATTTTGTAGATTCGTAATGA 4248
TTTTATATATATATGCTTTAGTAAATACTAATTTGTATGGTATTTGTCTGTCAAGCATGTAGTCAACTTATT 4320
AAATTCCAAATGAAATGTGACTACTAGTTTTATAAGTTGAAAGAGGTGACACTACTGCCATTGTTGTGTATA 4392
TTGTATCTTTTGGGTACTCATGTCTTTTGTCTGGGTAGTACTTCCTCTCTCTCTCTTTTATTTTTCCTTT 4464
TCATAAACAAAAGAAAACGAACATACAATTGGAAATTTGTTCAAAAACAATCACACCTTTTAAATACCAA 4536
TTCGAATCAATGTTTACTTTTGTCTAAAAAAGTTGTTGACAGATTTGAAGGGAGCTCGGCATTGGACTCAACT 4608
TCCAATGACTCTTACTTTAAAAATGCCACTGCAATCAATAACAAAGGATATGCCCTCCGAGTGTGAATGTC 4680
ATTCTCTACTTACTGCACACCAAAAGGTTTGAATCTTGGTTGATTACATCATAAGAATAACAACCAT 4752
GAACTCCCAATGCTTTATCTTCGTTATCGAATTTTTCGTATTCTATTAATGACGACGAACCATCAATTAT 4824
GGTGGTAATACTACCCAGGAACAAGCAGCTGCAG 4858

```

Figura 16: Secuencia nucleotídica del gen *ENG1* y secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica.

En negrita se muestra la posible caja TATA. Sombreadas se indican las dos supuestas señales cap. Subrayado y en negrita se resaltan los codones CTG que en *C. albicans* son traducidos por serina.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA PROTEICA CaEng1p.

El gen *ENG1* codifica un polipéptido de 1145 aminoácidos (CaEng1p), con una masa molecular teórica de 124,157 Dalton y un punto isoeléctrico teórico de 5,17, calculados ambos con el programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) (Bjellqvist *et al.* 1993; Bjellqvist *et al.* 1994). En el resto de la memoria y para simplificar, se citará la proteína CaEng1p como Eng1p. Sólo en caso de una posible confusión con las proteínas homólogas de otras levaduras se empleará CaEng1p.

La secuencia de aminoácidos muestra una región rica en residuos de Gln (68-95), otra zona rica en Ser y Thr (106-425), y once posibles sitios de N-glicosilación, que en las proteínas eucarióticas tiene lugar en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido menos Asp y Pro (Gavel and von Heijne 1990; Nilsson and von Heijne 2000). Esta combinación aparece en las posiciones 235-237 (Asn-Thr-Ser), 263-265 (Asn-Gly-Ser), 286-288 (Asn-Asn-Ser), 290-292 (Asn-Arg-Ser), 308-310 (Asn-Ser-Thr), 328-330 (Asn-Ser-Ser), 338-340 (Asn-Ser-Ser), 362-364 (Asn-

Resultados

Ser-Ser), 423-425 (Asn-Tyr-Ser), 502-504 (Asn- Val-Ser) y 775-777 (Asn-Met-Thr) (Figura 17A). Estos datos se han obtenido comparando la secuencia aminoacídica de Eng1p con la base de datos de familias proteicas y dominios PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite/>). Los tres aminoácidos más representados en la proteína son Ser (14,4 %), Thr (11,0 %) y Leu (8,3 %); datos obtenidos con el programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam/>).

Según la predicción del servidor SignalP del CBS (*Center for Biological Sequence Analysis*) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que permite predecir las secuencias más probables que pueden actuar como péptido señal, y los sitios de corte del mismo por la peptidasa señal (Nielsen *et al.* 1997), se ha determinado que en Eng1p existiría un posible punto de corte entre la Ala¹⁸ y el Glu¹⁹ (Figura 17A), que definiría un péptido líder de 18 aminoácidos.

El perfil hidropático de la proteína Eng1p, obtenido mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte and Doolittle 1982), muestra una alternancia de dominios hidrofóbicos e hidrofílicos, con mayor predominio de estos últimos, como corresponde a una proteína globular soluble (Figura 17B). Cabe destacar la existencia de un dominio marcadamente hidrofóbico en el extremo aminoterminal, característico de las secuencias señal de las proteínas cuyo destino final en la célula implica la entrada en el lumen del retículo endoplásmico.

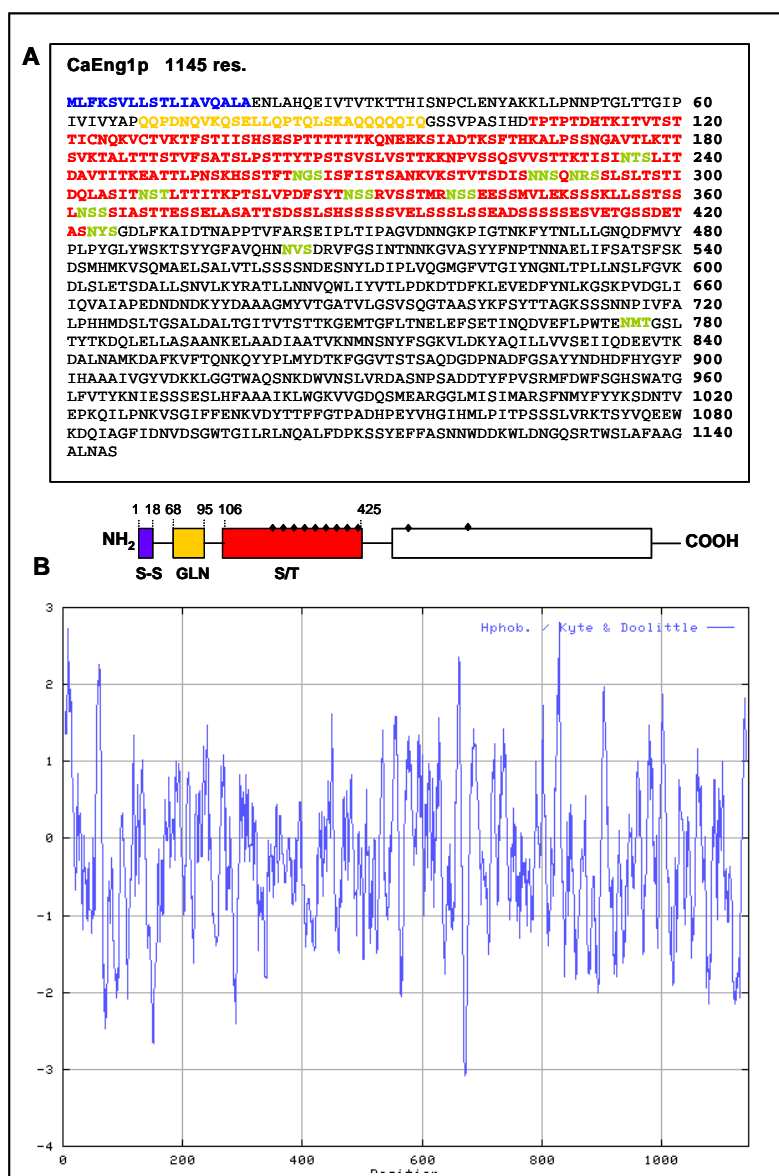


Figura 17: Características de la secuencia proteica Eng1p.

A) Secuencia y esquema de la proteína Eng1p en los que se señala el posible péptido señal (azul), zona rica en residuos de Gln (amarillo), región rica en Ser y Thr (rojo) y potenciales posiciones de N-glicosilación (verde en la secuencia y puntos negros en el esquema). B) Perfil de hidrofobicidad de la proteína. Obtenido mediante el programa ProtScale Tool (<http://www.expasy.ch/tools/pscale/Hphob.Doolittle.html>), que representa la hidrofobicidad de la secuencia proteica y permite predecir las regiones interiores y exteriores de la proteína usando el método de Kyte y Doolittle. En ordenadas se representa el índice hidrofóbico de cada uno de los aminoácidos señalados en abscisas.

3. DELECIÓN DEL GEN *ENG1* EN *Candida albicans*.

Para abordar el estudio de la función de este gen en la biología celular de *C. albicans*, se procedió a la delección del mismo empleando el sistema de interrupción descrito por Fonzi e Irwin (Fonzi and Irwin 1993), que consiste en el uso de una construcción genética formada por la casete de interrupción *hisG-URA3-hisG* flanqueada por dos zonas homólogas al gen que se quiere interrumpir. *hisG* es un gen de *Salmonella typhimurium* implicado en la síntesis de histidina, cuya función en esta casete es actuar como espaciador no específico, mientras que el gen *URA3* codifica la orotidina descarboxilasa, implicada en la síntesis de uracilo en *C. albicans*.

La cepa de *C. albicans* utilizada fue la CAI4 (Fonzi and Irwin 1993), que carece del gen *URA3* y que deriva de la silvestre SC5314 (Gillum *et al.* 1984). Disponíamos del gen *ENG1* en el plásmido pPECa7, amablemente cedido por el Dr. Francisco del Rey (Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca). Cuando se comenzó este trabajo, sólo se conocía la secuencia de 2 kb del gen (desde el punto de corte *Sal I* situado a 1359 pb desde el codon de inicio ATG hacia el codon STOP), de un total de 3,4 kb que es el tamaño de la secuencia completa de *ENG1* (Figura 18). Para la interrupción de dicho gen, se construyó el plásmido pIR3 (Figura 11. Materiales y Métodos), en el que parte del marco abierto de lectura del gen (fragmento *Sal I-Cla I* de 1,6 kb) ha sido reemplazado por la construcción *hisG-URA3-hisG* de 4 kb, manteniéndose a ambos lados una zona de aproximadamente 600 pb para permitir la recombinación homóloga. Con el fragmento *Sal I-Cla I* se elimina la presunta zona catalítica de la proteína que contiene los motivos NEP y D-H-H-H-Y conservados en glucanasas (Esteban *et al.* 1999). Tras digestión del plásmido pIR3 con la enzima de restricción *Spe I*, se obtuvo la construcción de interrupción de 5,24 kb. La integración de la misma en el genoma de *C. albicans* permitió obtener el mutante heterocigótico CNC61 (*ENG1/Δeng1::hisG-URA3-hisG*). La expulsión del gen *URA3* mediante recombinación de las dos copias del gen *hisG* flanqueantes y la selección en placas suplementadas con el antimetabolito ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), que permite el crecimiento de células auxótrofas para uracilo y no las protótrofas (Boeke *et al.* 1987), originó la cepa CNC62 (*ENG1/Δeng1::hisG*).

La misma construcción de 5,24 kb fue empleada para delecionar la segunda copia silvestre del gen *ENG1*, obteniendo la cepa CNC63 (*Δeng1::hisG/Δeng1::hisG-URA3-hisG*) con la que hemos realizado la caracterización fenotípica. La expulsión, nuevamente, del gen *URA3* y posterior selección en placas suplementadas con 5-FOA, originó la cepa CNC64 (*Δeng1::hisG/Δeng1::hisG*) (Figura 19).

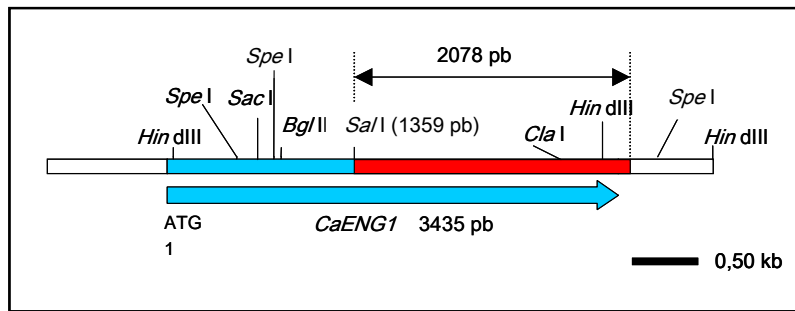


Figura 18: Mapa físico del gen *ENG1*.

Mapa físico del fragmento de 5,08 kb que comprende el gen *ENG1* (en rojo la zona de 2 kb secuenciada cuando se comenzó el trabajo, en azul la no secuenciada).

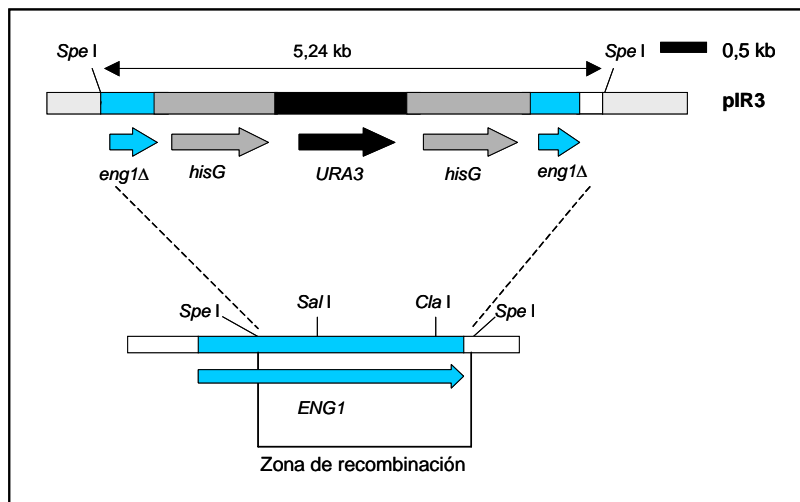


Figura 19: Estrategia de interrupción del gen *ENG1*.

La comprobación de la integración correcta se realizó mediante PCR en el caso del primer alelo del gen, con el objetivo de disminuir el número de transformantes a analizar posteriormente mediante hibridación DNA-DNA. La expulsión correcta del gen *URA3* por recombinación intracromosómica, así como la confirmación de la integración en el primer y segundo alelo de *CaENG1* se realizó mediante hibridación DNA-DNA (Figura 20).

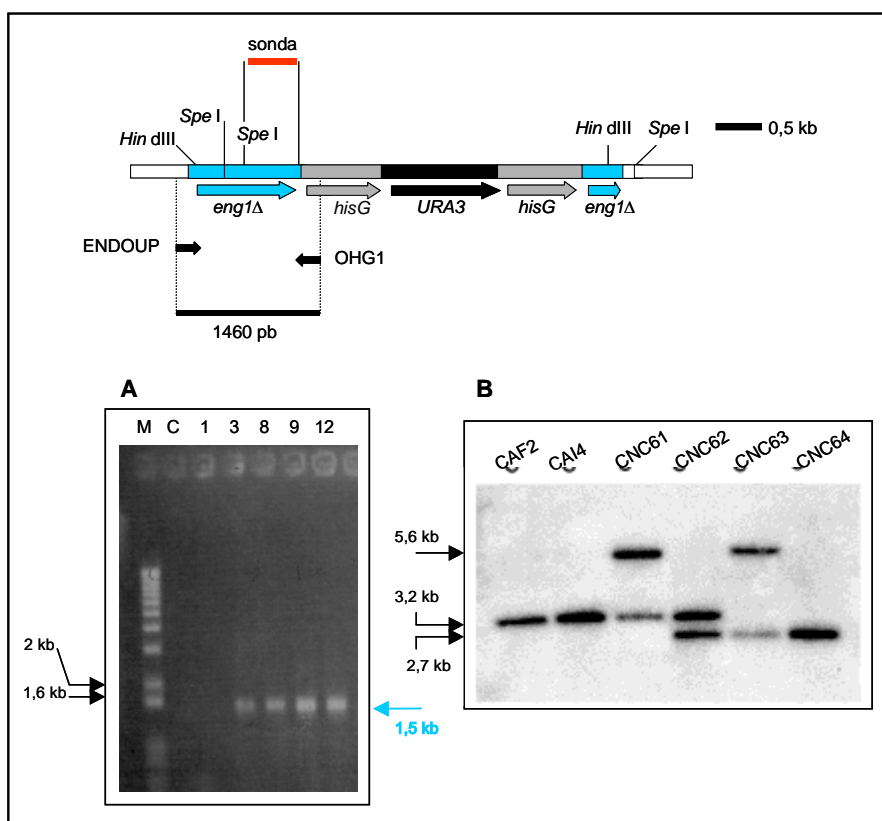


Figura 20: (A) Comprobación de la interrupción del primer alelo del gen *ENG1* mediante PCR y (B) análisis de las cepas con un alelo y dos alelos del gen *ENG1* deletados, mediante hibridación DNA-DNA.

A) Los oligonucleótidos ENDROUP y OHG1 fueron empleados para detectar la correcta integración de la construcción de interrupción en el locus *ENG1*, mediante amplificación de una banda de 1460 pb. ENDROUP hibrida 6 pb antes del codon de inicio ATG del gen *ENG1*. OHG1 hibrida en la posición +135 desde el codon de inicio del gen *hisG*. M, Marcador de peso molecular de DNA: 1 Kb Plus DNA Ladder. C, CA14, es la cepa huésped. 1,3,8,9 y 12 son diferentes transformantes analizados. Las flechas negras indican los marcadores de peso molecular y su tamaño en kb. La flecha azul señala las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en kb.

B) El DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Hin dIII*. La sonda empleada de 0,5 kb corresponde al fragmento *Sa/I-Spe I* del plásmido pPECa26 (Dr. Francisco del Rey. Univ. Salamanca). La banda de 3,2 kb corresponde al locus silvestre del gen *CaENG1*, la de 5,6 kb al mismo locus deletado e interrumpido por la casete *hisG-URA3-hisG* y la de 2,7 kb al mismo locus interrumpido únicamente por *hisG*. Las flechas negras señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en kb.

4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA CARENTE DEL GEN *ENG1*.

Se han elegido para los ensayos las correspondientes cepas protótrofas para uracilo, con el objetivo de minimizar la influencia del fondo genético Ura⁻ en el fenotipo estudiado (Navarro-García *et al.* 1995). Por este motivo, consideramos que la cepa control adecuada era la cepa CAF2 (Δ ura3:: λ imm434/*URA3*), interrumpida en un alelo *URA3* y por tanto, protótrofa para uracilo al disponer del otro alelo intacto. Sin embargo, cuando se comenzó el estudio, no disponíamos de la misma, usando por ello como cepa control la silvestre SC5314. Posteriormente se ha comprobado que el comportamiento de ambas cepas es similar, al menos para todos los ensayos realizados a lo largo de esta memoria.

En la tabla 3 de Materiales y Métodos se ha indicado la nomenclatura abreviada que se usará para citar las distintas cepas. Sin embargo, en este epígrafe dedicado a la caracterización fenotípica de la cepa carente del gen *ENG1*, se utilizará *ENG1/eng1* y *eng1/eng1* para referirnos a las cepas heterocigótica y homocigótica delecionadas en dicho gen, respectivamente.

4.1. Crecimiento en medio líquido y morfología celular.

Para comenzar el estudio del gen *ENG1* se realizó una cinética de crecimiento en medio líquido, con el objetivo de observar si la carencia del mismo afectaba al crecimiento. Este experimento se llevó a cabo en un medio rico como YPD y en un medio pobre en nutrientes como el medio mínimo (MM) suplementado con aminoácidos. La temperatura del ensayo fue de 37 °C, se realizó en agitación y se valoró el crecimiento durante 48 horas. Tanto el tiempo medio de generación estimado (90 min. en YPD y 120 min. en MM), como la densidad óptica final alcanzada en fase estacionaria (26 unidades en medio rico y 9 unidades en medio mínimo), fue similar para la cepa silvestre SC5314 y las cepas mutantes heterocigótica (*ENG1/eng1*) y homocigótica (*eng1/eng1*) en el gen *ENG1* (Figura 21). Este resultado indica que *ENG1* es dispensable para el crecimiento de *C. albicans* en las condiciones ensayadas.

La morfología de las tres cepas fue observada durante su crecimiento por microscopía de contraste de fases, no apreciándose ningún defecto morfológico en las cepas *ENG1/eng1* y *eng1/eng1*.

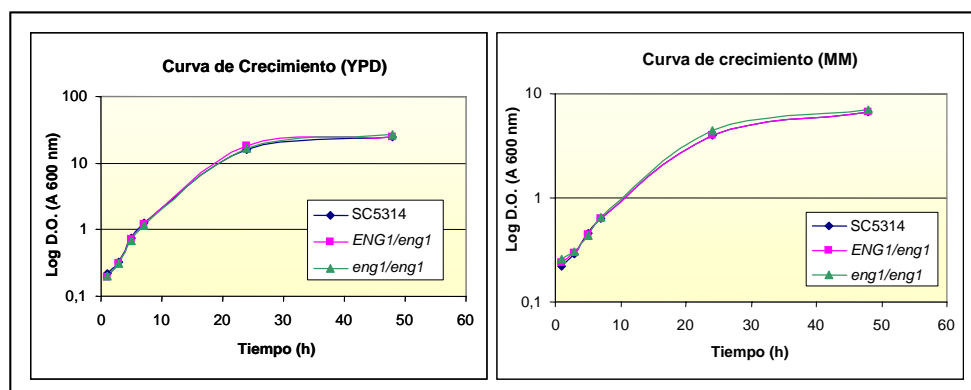


Figura 21: Curvas de crecimiento en medio líquido.

4.2. Estudio de la transición morfológica.

C. albicans es un microorganismo polimórfico que puede presentar diversas morfologías en función de las condiciones ambientales. La transición morfológica es una de las características más importantes a estudiar en este hongo, ya que se ha relacionado con su capacidad patógena (Odds 1994). En determinadas condiciones la levadura es capaz de emitir un tubo germinativo que dará lugar a un filamento. Hay factores de diversa naturaleza que inducen la transición levadura-hifa: factores ambientales como la temperatura y el pH, y nutricionales como la presencia de suero, prolina, N-acetilglucosamina, etc.

A) Filamentación en medio líquido.

Este ensayo se realizó en 100 % de suero de ternera fetal (STF) como medio inductor de la filamentación, como ha sido descrito en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Se llevó a cabo un seguimiento mediante observación microscópica del comportamiento de las cepas a 37 °C, tomando fotografías a 0, 2, 5, y 24 horas después de la inoculación. A las dos horas del ensayo las levaduras habían emitido un tubo germinativo que presentaba un tamaño similar en todas las cepas ensayadas. Las fotografías tomadas tras cinco horas de incubación muestran unos filamentos largos con tendencia a agregarse y muy pocas levaduras en todos los casos. Después de 24 horas de ensayo, aparecen numerosas blastosporas junto a agregados de filamentos que originan precipitados fácilmente observables (Figura 22).

Se puede concluir que las dos cepas mutantes *ENG1/eng1* y *eng1/eng1* generan filamentos largos en el transcurso del experimento, similares a los de la cepa silvestre, y

que no se observan diferencias significativas respecto del tiempo de aparición de los tubos germinativos en los tres casos. Por tanto, la delección del gen *ENG1* no afecta de forma relevante a la transición levadura-hifa en las condiciones ensayadas.

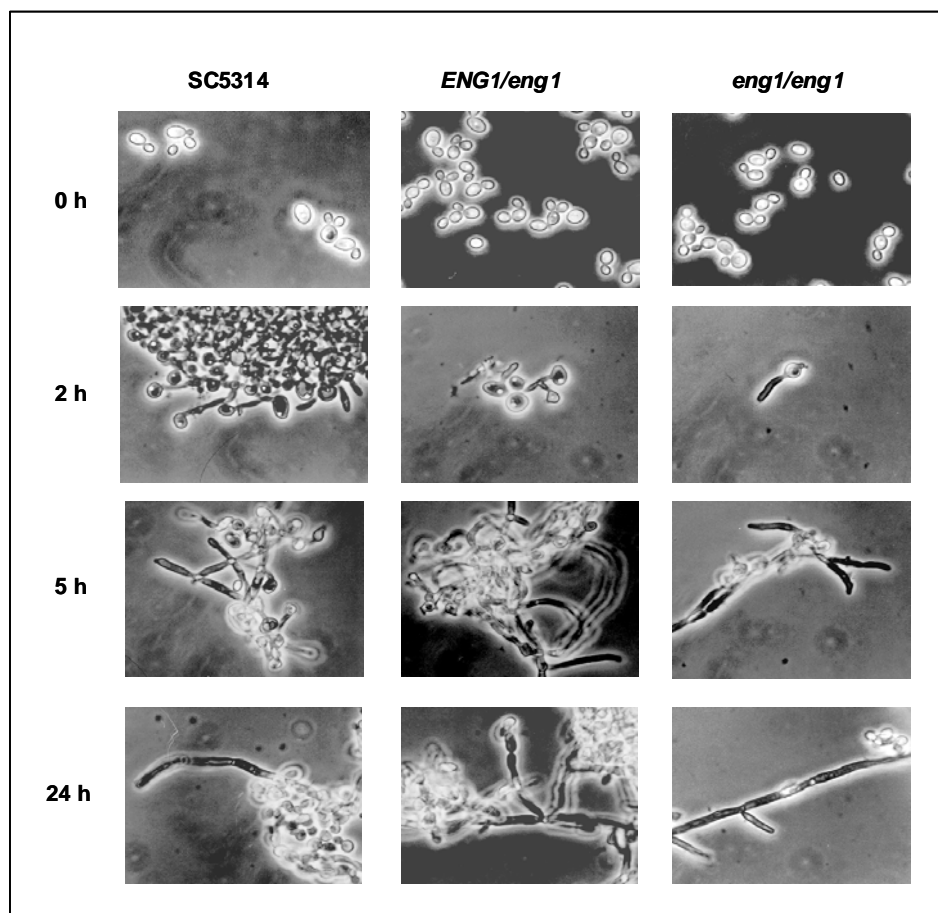


Figura 22: Ensayo de filamentación en 100 % de STF.

B) Morfología colonial e invasividad en placa.

Otra aproximación utilizada para estudiar la transición morfológica en *C. albicans* es observar la morfología colonial, la cual se puede considerar como un reflejo de la morfología celular. Para ello se analizaron las colonias obtenidas tras siete días de incubación a 37 °C en diferentes medios sólidos: SLAD, un medio nutricionalmente

pobre que induce crecimiento invasivo o pseudofilamentoso en *S. cerevisiae* (Gimeno *et al.* 1992); Spider, descrito como medio inductor de la filamentación en *C. albicans* (Liu *et al.* 1994), y basado en la utilización de una fuente de carbono alternativa como manitol; y medio de Lee a pH=7, también descrito como inductor de la filamentación en esta levadura (Lee *et al.* 1975).

Las colonias que crecen en medio SLAD, tanto en el caso de la cepa silvestre como de las cepas *ENG1/eng1* y *eng1/eng1*, presentaron un aspecto liso con bordes filamentosos que se observan con más detalle en la fotografía tomada con el objetivo de 4 aumentos (Figura 23). La morfología colonial contemplada en medio de Lee a pH=7, se caracteriza por presentar una superficie rugosa con unos bordes muy filamentosos. Con el objetivo de 10 aumentos se aprecia con mayor precisión que estos bordes están constituidos por largos filamentos (Figura 23). Tras lavar las colonias con agua como ha sido descrito en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos, se puede advertir una penetración grande de las mismas en el agar (Figura 24). Tanto la morfología colonial como la invasividad descrita es semejante en la cepa heterozigota, la cepa doblemente delecionada u homozigota y la cepa SC5314. En medio Spider, el comportamiento de las tres cepas analizadas también es similar: la superficie de las colonias se muestra considerablemente rugosa con unos bordes coloniales altamente filamentosos (Figura 23). Después de lavar las colonias con agua, se observa una elevada invasividad (Figura 24).

Estos resultados indican que la deleción de *ENG1* no afecta de forma sustancial ni la morfología colonial ni la invasividad.

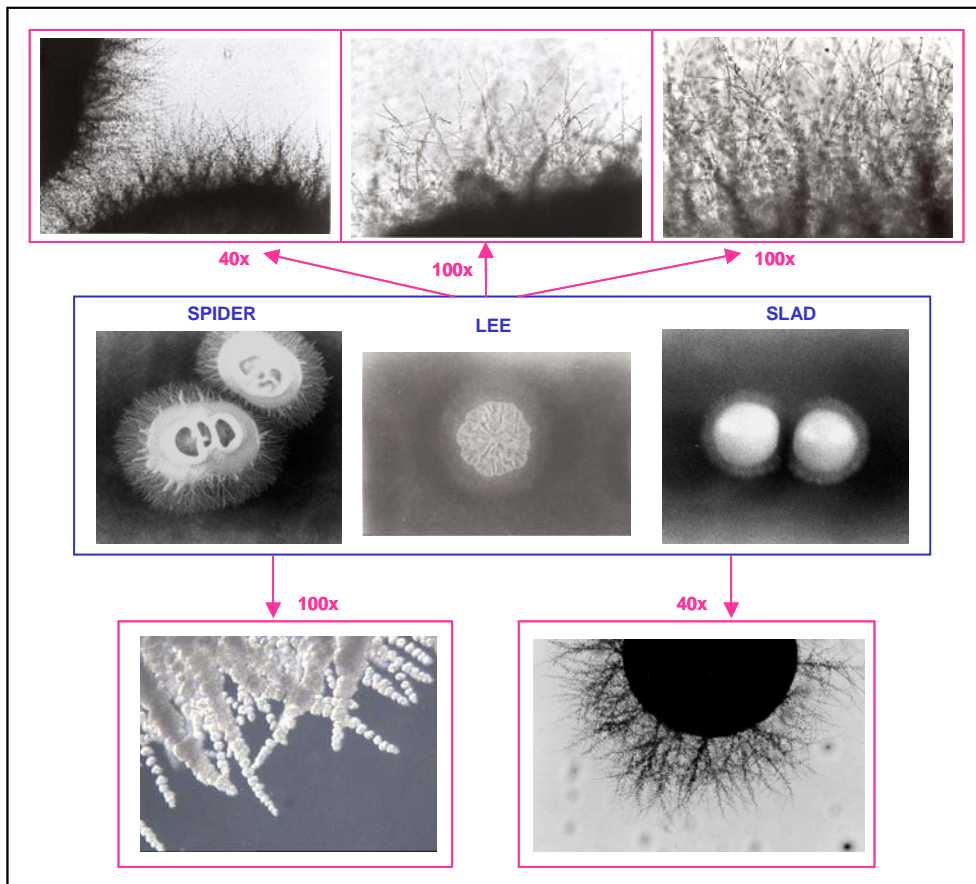


Figura 23: Morfología colonial en medios SLAD, Spider y medio de Lee.

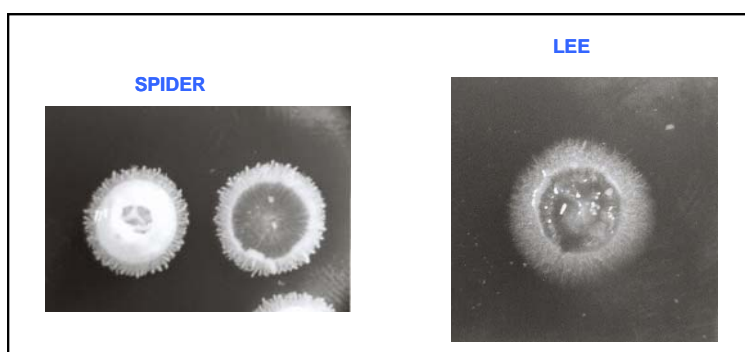


Figura 24: Invasividad en placa en medio Spider y medio de Lee.

4.3. Arquitectura de la pared celular.

El gen *ENG1*, por su homología con otras endo- β -1,3-glucanasas de levadura descritas, parece dar lugar a una proteína cuya función se localizaría en la pared celular de la levadura. Por este motivo, hemos realizado una serie de experimentos, englobados bajo el título de “Arquitectura de la pared celular”, destinados a estudiar la posible implicación de *ENG1* en la construcción y el mantenimiento de esta estructura celular.

A) Sensibilidad a la toxina killer K-500 de *Williopsis mrakii*.

La levadura *Williopsis mrakii* NCYC500 produce una toxina *killer* denominada K-500, que tiene una elevada actividad anti-*Candida* (Walker *et al.* 1995).

El mecanismo de acción y los efectos letales ejercidos por las toxinas *killer* en las células sensibles a las mismas han sido investigados en muy pocos casos. La toxina *killer* K1 de *S. cerevisiae* ha sido bastante estudiada y parece formar poros en la membrana previa unión a un receptor de la pared celular, que probablemente es el β -1,6-glucano (Hutchins and Bussey 1983). Por otra parte, estudios realizados con la cepa de *Williopsis mrakii* LKB169, sugieren que la toxina *killer* producida por esta levadura (HM-1) inhibe la biosíntesis del β -1,3-glucano, convirtiendo la pared celular en una estructura frágil osmóticamente que conduciría a la lisis celular (Yamamoto *et al.* 1986). Todavía se desconoce el mecanismo mediante el cual la toxina K-500 ejerce su actividad letal. Algunas evidencias parecen sugerir que esta toxina produciría canales en la membrana de las células sensibles, originando la pérdida de iones y conduciendo a la muerte celular (Hodgson *et al.* 1995), de forma similar a la toxina K1 de *S. cerevisiae*.

Los estudios de sensibilidad a esta toxina, ensayados cuantificando el halo de inhibición producido por la cepa *killer* alrededor de cada gota depositada de la misma, no mostraron ninguna diferencia importante entre el comportamiento de la cepa silvestre SC5314 y las cepas homocigótica y heterocigótica carentes del gen *ENG1* (Figura 25).

También se ensayó la sensibilidad a la toxina *killer* HM-1 de *W. mrakii*, advirtiéndose que ninguna de las cepas de *C. albicans* empleadas manifestó sensibilidad alguna a esta toxina, como se puede apreciar en la figura 25.

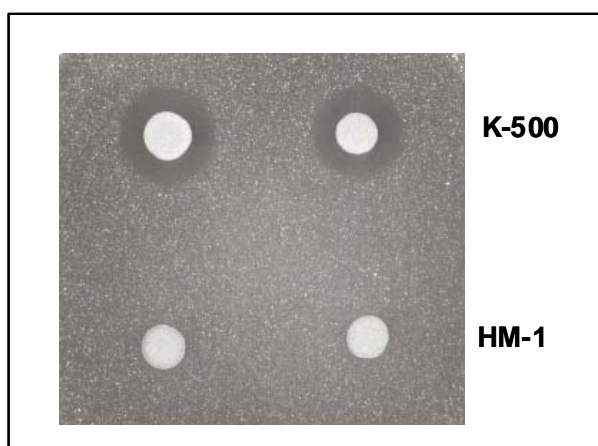


Figura 25: Sensibilidad a las toxinas *killer* K-500 y HM-1 de *W. mrakii*.

El halo de inhibición medido en todas las cepas fue de 1,1-1,2 cm.

B) Sensibilidad a antifúngicos y distintos agentes que interfieren con el metabolismo celular.

El estudio de sensibilidad frente a compuestos antifúngicos y sustancias de muy diversa estructura química y mecanismo de acción que interfieren con el metabolismo celular, puede revelar importantes defectos en funciones o estructuras celulares. Por ello planteamos conocer la sensibilidad de la cepa mutante carente del gen *ENG1* frente a una batería de compuestos con actividad anti-*Candida*.

El experimento fue realizado como se describe en el epígrafe 7 de Materiales y Métodos, teniendo en cuenta que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antifúngico es la concentración más baja en la cual se inhibe el 100 % del crecimiento.

Los compuestos ensayados han sido: **ortovanadato sódico** e **higromicina B** (algunos mutantes que tienen la pared celular o la membrana plasmática dañada son más permeables a higromicina B, permitiendo su paso al citoplasma donde provoca el daño celular (Southard *et al.* 1999; Dean 1995; Ballou *et al.* 1991; Kanik-Ennulat *et al.* 1995). Los mutantes afectados en la ruta de integridad celular también son más sensibles a ortovanadato sódico (Martín *et al.* 2000) y además, los mutantes con defectos en la glicosilación de proteínas son sensibles a higromicina B y resistentes a ortovanadato sódico; la **anfotericina B**, el **fluconazol** y el **itraconazol** (compuestos que interfieren con la biosíntesis del ergosterol de la membrana plasmática); **tricodermol** (compuesto que interfiere con la síntesis de proteínas), **5-fluoritosina** (inhibidor de la biosíntesis de ácidos nucleicos) y la **ciclosporina** (inhibidor de la fosfatasa calcineurina).

No se observaron diferencias entre las cepas *ENG1/eng1*, *eng1/eng1* y la cepa SC5314, respecto de la sensibilidad a tricodermol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B, higromicina B, 5-fluoritosina, ortovanadato sódico y ciclosporina (tabla 11).

Resultados

Teniendo en cuenta los resultados comentados, podemos concluir que la delección de *ENG1* no afecta de forma significativa la sensibilidad de *C. albicans* a estos compuestos.

Tabla 11: Sensibilidad a compuestos antifúngicos mediante determinación de la CMI.

ANTIFÚNGICO	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	CAF2	<i>ENG1/eng1</i>	<i>eng1/eng1</i>
Anfotericina B	1,8	1,8	1,8
Itraconazol	0,51	0,51	0,51
Fluconazol	1,03	1,03	1,03
Ciclosporina	100	100	100
Tricodermol	5	5	5
5-fluoritosina	0,052	0,052	0,052
Ortovanadato sódico	>200	>200	>200
Higromicina B	>500	>500	>500

C) Sensibilidad a zimoliasa.

La zimoliasa es una mezcla de enzimas hidrolíticas que está constituida principalmente por β -1,3-glucanasas y proteasas y que digiere la pared celular de levaduras. En condiciones adecuadas, esta digestión puede provocar la lisis celular, y su cuantificación puede constituir una medida del grado de resistencia de la pared celular. La diferente sensibilidad de las levaduras a enzimas líticas de la pared ha sido ampliamente utilizada para detectar cambios en la composición y organización de la pared celular (Lussier *et al.* 1997; Navarro-García *et al.* 1995; Ovalle *et al.* 1998).

Dada la presunta implicación del gen *ENG1* en la biosíntesis de la pared celular, se llevó a cabo este experimento cuantificando el grado de muerte celular durante cuatro horas. Se optimizó la concentración de zimoliasa a utilizar ensayando varias concentraciones y observando que $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ era la más adecuada para poder detectar alguna diferencia significativa.

La viabilidad celular de las cepas que no han sido tratadas con zimoliasa (controles) permanece constante a lo largo del ensayo. A los 20 min. del inicio del experimento, el porcentaje de muerte celular se aproxima al 50 % en todos los casos. La primera parte de la disminución de la D.O. expresada en forma logarítmica (los primeros

45 min.), se aproxima a una cinética lineal frente al tiempo, pudiéndose observar que la pendiente de las rectas es bastante semejante (los valores estimados de la pendiente de cada recta son: -0,014 (SC5314), -0,015 (CAF2), -0,019 (*ENG1/eng1*) y -0,019 (*eng1/eng1*). $R=0,99$), indicando que no hay diferencias importantes de sensibilidad a zimoliasa entre la cepa parental y los mutantes *ENG1/eng1* y *eng1/eng1* (Figura 26). También se puede concluir que la cepa CAF2 manifiesta una sensibilidad a zimoliasa semejante a la cepa SC5314.

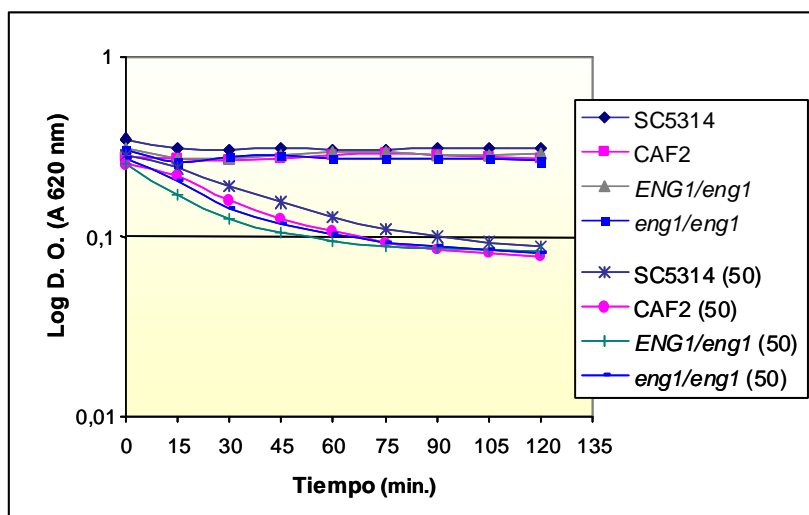


Figura 26: Sensibilidad a zimoliasa.

Variación de la absorbancia en función del tiempo de digestión con zimoliasa. El valor 50 (entre paréntesis en algunas series) muestra los resultados cuando se utilizó una concentración de zimoliasa de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.4. Análisis fenotípico mediante citometría de flujo.

Con el objetivo de observar la posible existencia de alguna diferencia funcional o estructural de las cepas silvestre y delecionada en *ENG1* que nos permitiese profundizar posteriormente en el estudio del papel de dicho gen, se empleó la citometría de flujo con diferentes fluorocromos que permitieron cuantificar varios parámetros celulares como la **viabilidad** (IP), el contenido de **quitina** de la pared celular (blanco de calcoflúor), el contenido en **proteínas totales** (FITC), el contenido de **lípidos totales** (RN), el **potencial de membrana mitocondrial** (Rh123) y la **actividad peroxidasa citosólica** (DCFH-DA).

El porcentaje de células vivas, estimado como el porcentaje de aquellas que no emiten fluorescencia roja al ser incubadas con el fluorocromo IP, es cercano al 100 %,

Resultados

tanto en la cepa silvestre SC5314, como en la cepa de referencia CAF2, como en las cepas mutantes *ENG1/eng1* y *eng1/eng1* (Figura 27). El contenido de quitina, proteínas y lípidos totales, medido como intensidad media de fluorescencia tras la incubación con los respectivos fluorocromos, blanco de calcoflúor, FITC y RN, parece similar en todos los casos. Los fluorocromos DCFH-DA y Rh 123, manifiestan una intensidad media de fluorescencia parecida en todas las cepas incubadas con dichos fluorocromos; por tanto, ni la actividad peroxidasa citosólica ni el potencial de membrana mitocondrial parecen verse afectados por la delección del gen *ENG1* (figura 27).

Podemos concluir que las cepas SC5314 y CAF2, empleadas como cepas control de los experimentos, presentan unos parámetros celulares estimados mediante fluorescencia semejantes y que la delección del gen *ENG1* no afecta significativamente al valor de los mismos.

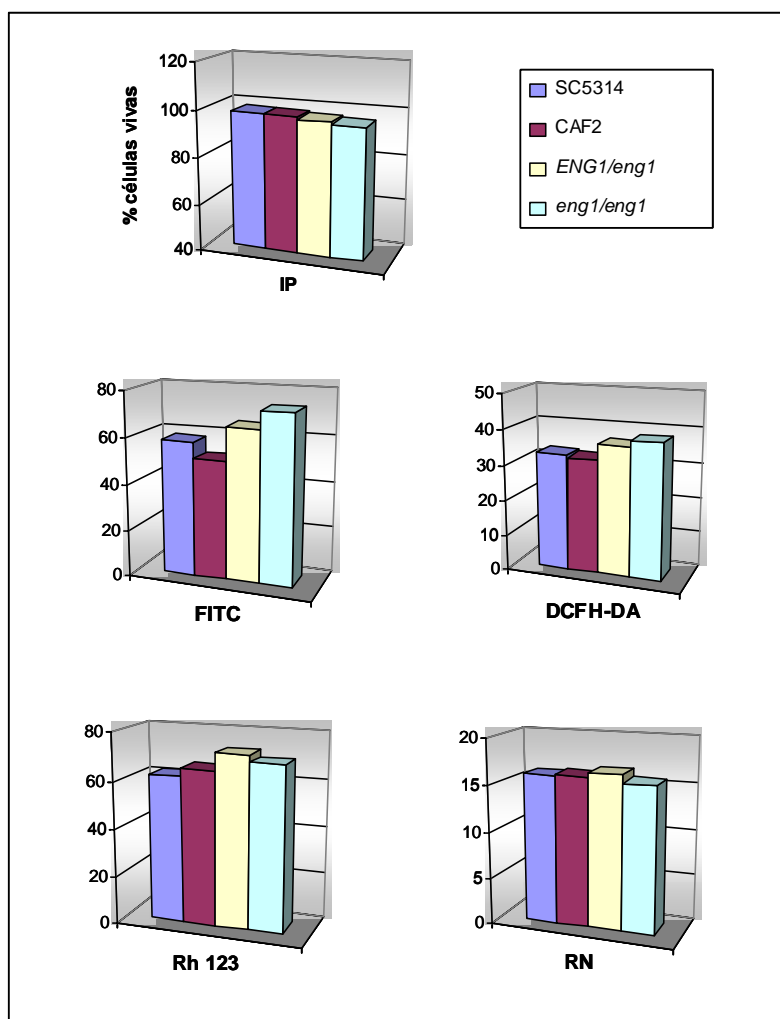


Figura 27: Análisis de la viabilidad celular, contenido de proteínas y lípidos totales, potencial de membrana mitocondrial y actividad peroxidasa citosólica.

La estimación de la viabilidad celular se expresa como porcentaje de células vivas. La estimación del resto de los parámetros se expresa como intensidad media de fluorescencia.

4.5. Virulencia en un modelo murino.

La pared celular es una estructura fúngica esencial que está involucrada en varios procesos fisiológicos. Esta estructura es antigénica, participa en el fenómeno de adhesión –y por tanto de colonización– y puede modular la respuesta inmunológica durante la infección. Además, su ausencia en las células de mamífero la convierte en una diana muy atractiva en la búsqueda de antifúngicos. Por estas razones, se ha estudiado el posible papel de diferentes genes de la pared celular como dianas antifúngicas, mediante estudios de virulencia (Navarro-García *et al.* 2001). El intento de desvelar una relación entre el gen *ENG1* y la patogenicidad de *C. albicans* se presenta como una posibilidad muy interesante.

Como ya ha sido descrito en el apartado 11 de Materiales y Métodos, se han utilizado dos estirpes de ratón: BALB/c, que es menos susceptible a la infección sistémica por *C. albicans* y DBA/2, más susceptible a la misma (Hector *et al.* 1982). El curso de la infección fue monitorizada evaluando el porcentaje de supervivencia de los ratones en el tiempo y cuantificando la carga fúngica en el riñón y el cerebro de los ratones.

Cuando se inocula la dosis más baja de levaduras (1×10^5 cél.) en la estirpe de ratón más resistente a la enfermedad (BALB/c), se establece una situación de infección crónica en los ratones (Figura 28). A las dosis infectivas de 1×10^6 y 1×10^7 células, no sobrevive ningún ratón a los 10 y a los 2 días de la infección, respectivamente, para las tres cepas ensayadas. Cuando la infección se lleva a cabo en la estirpe de ratón más susceptible a la misma (DBA/2), a cualquier dosis infectiva se observa una rápida mortalidad de los ratones entre los días 2 y 6, para todas las cepas de levadura ensayadas (Figura 28). La capacidad de colonización de las diferentes cepas de levadura en el riñón y el cerebro de los ratones fue estimada a diferentes tiempos durante la infección: en la estirpe BALB/c, se midió los días 1, 3 y 30 tras la inoculación de las dosis infectivas 1×10^7 cél., 1×10^6 cél. y 1×10^5 cél. respectivamente. En la estirpe de ratón DBA/2, se midió los días 1 y 3 después de la inoculación de 1×10^6 cél. y 1×10^5 cél. respectivamente (Figura 29). A la dosis de 1×10^5 cél., a día +30, un 75 % de los ratones BALB/c aclara la infección en riñón. A esta misma dosis infectiva, no se recupera ninguna levadura viable del cerebro de dichos ratones. Comparando el alojamiento en riñón y cerebro para cada estirpe de ratón, se deduce de los experimentos que, las distintas cepas de *C. albicans* presentan un alojamiento mayor en

Resultados

el riñón de los ratones que en el cerebro, ya que se recogen mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) del primer órgano analizado (log UFC entre 4 y 7) que del segundo (log UFC entre 3 y 5) (Figura 29). En cualquier caso, las levaduras son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

Teniendo en cuenta todos los resultados podemos concluir, en primer lugar, que la cepa CAF2, que posee un alelo del gen *URA3* interrumpido, es tan virulenta como la cepa silvestre SC5314 y por tanto, que la carencia de un alelo del gen *URA3* no influye significativamente en la patogenicidad de *C. albicans*, al menos en este modelo murino de infección sistémica. En segundo lugar, ni los porcentajes de supervivencia a lo largo de la infección, ni los alojamientos de las levaduras en el riñón y en el cerebro de los ratones, parecen estar afectados por la delección del gen *ENG1*, puesto que la cepa *eng1/eng1* se comporta de manera similar a la cepa silvestre.

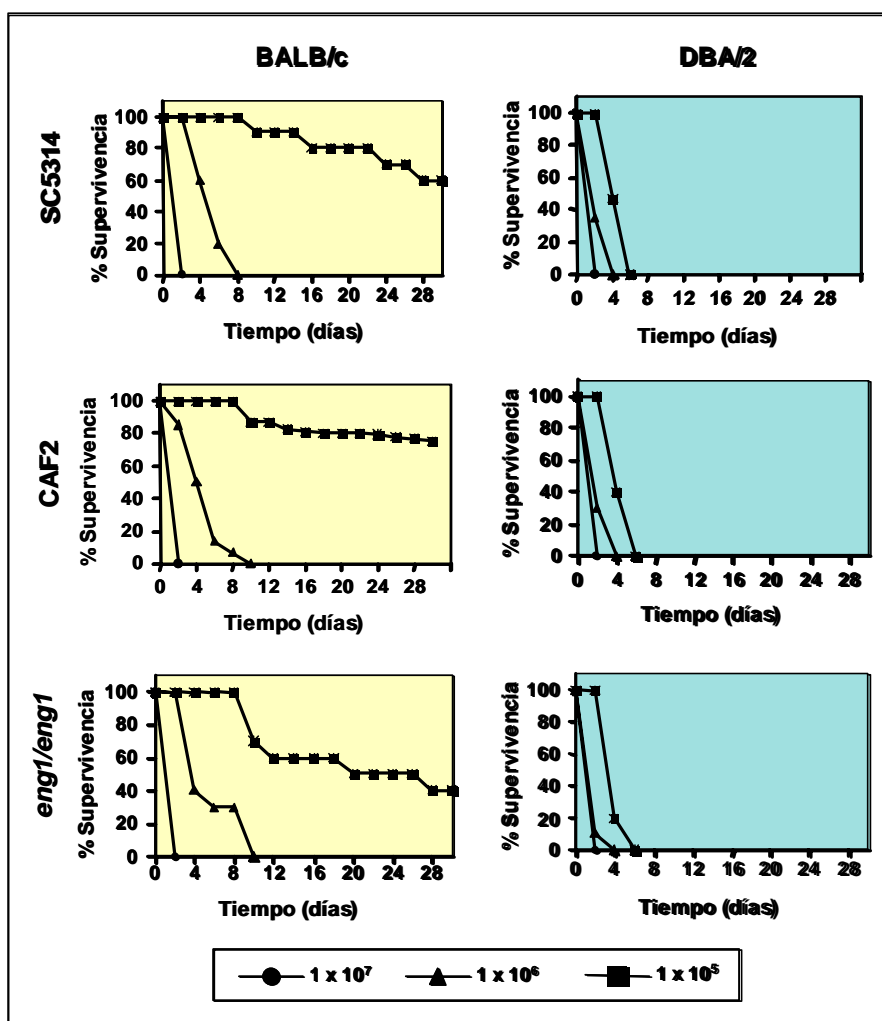


Figura 28: Porcentaje de supervivencia de los ratones en el transcurso de la infección.

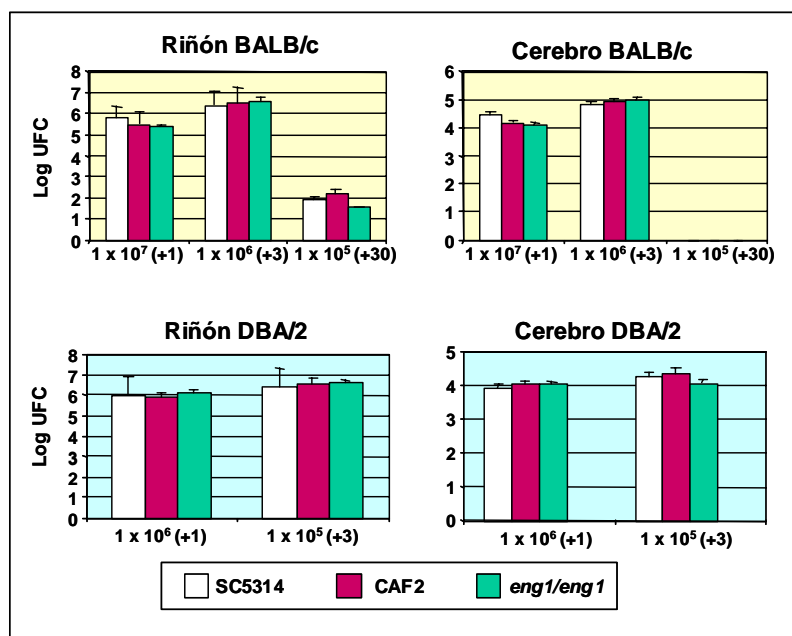


Figura 29: Alojamiento de las distintas cepas ensayadas en riñón y cerebro.

5. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN *CaENG2*.

Mientras se realizaba la caracterización fenotípica de la cepa carente del gen *ENG1*, se comparó la secuencia del mismo con la base de datos que disponía de la parte secuenciada del genoma de *C. albicans* (www-sequence.stanford.edu/group/Candida/), identificándose un nuevo fragmento de DNA en el genoma de esta levadura y cuya secuencia proteica parecía ser muy semejante a la secuencia de la proteína Eng2p de *S. cerevisiae* (Dr. Francisco del Rey. Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca). Motivo por el que este gen ha sido denominado *CaENG2*. De forma similar a *ENG1*, a partir de este momento y para simplificar, se hará referencia al gen *CaENG2* como *ENG2*. Sólo en caso de una posible confusión con sus homólogos en otras levaduras se usará *CaENG2*.

Resultados

El análisis de la secuencia de nucleótidos ha revelado la existencia de un único marco abierto de lectura de 2202 pb que codifica un polipéptido de 734 aminoácidos. En la figura 30 se muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 3005 pb que contiene el gen *ENG2* y su traducción a aminoácidos, junto con las regiones 5' y 3' adyacentes.

En dicha secuencia hay que destacar la presencia de una posible “caja TATA” en la zona promotora, en la posición 184, situada a 289 pb del codon de inicio de la traducción y una posible señal cap en la posición 220, a 35 pb de la supuesta “caja TATA”.

Respecto al código genético usado en la traducción del gen *ENG2* a proteína, existe un codon CTG en la posición 712 que codifica para serina en el caso de *C. albicans*, en vez de leucina que es lo establecido en el código genético universal.

```
TCTAGATGTGCAATGTAGCGATTCCCTGAAATGGCCATAATCCACCCATTCTCTTCCAAGTTTGTGGAT 72
ATAACTAACGGAAGCAATGTCAAAAGTGCAAGTAGTTTCATACTAATCTGTGTTTGTAGTTAGTTAAAT 144
AATCTGTTTGGTCTCGAAAGAATATTCTTCAGGTATTTATATATATTACAGCTTTATCGGAATTTATATCG 216
CGTTCAAAACATCTTCGATAAGGCGAAAAATCTTCCAAATCGGGAGTGTCCGCTAAAAATTCCATTTAACAG 288
GGGGTAGTAGCCAAAATGGAAATTTCAAGTTTTCGCTGTGGGCTTTTGTGATTCCAGCAATAAACACAAA 360
GACTTCCCCGAAACGCAACACAACGAGCACCAGAAAGAAATAGAAAAAAATAATCAACTACGATTGTCAA 432
TTGCATCCTTTTACAAACCACGAAGAATTTTGAGTTCAAATGGGATTAAGAGATTGAAAAATGTATTCAA 504
      M G L R D L K N V F K

GCGTAAGGAATACGATAGACCTCCAGCTCCTCCGCCACCAAGATCGCAACCAACGAAGAGCCAATTAGAGA 576
      R K E Y D R P P A P P P P R S Q P N E E P I R D

TTCCAACCTGCGCCGACTTCCACTCAACCAGTAAATGGGAAGGATATTCTTAGCAATCCTATAGCAACTGG 648
      S N P A P T S T Q P V N G K D I L S N P I A T G

CGAACCGCCTTCCCTTTTCAAAGATTCAAACATCAGCAACAACCAATTGGATGCTGTTGTGACGAAAAAGA 720
      E P P S L F K R F K H Q Q Q P I G C C C D E K D

TGCCCCAATCCATACAAATAACTTTTATAACAATTTAACCACCGGTGACCAACCATGCCAATTTGGCCATT 792
      A P I H T N N F Y N N L T T G D Q T M P I W P L

GCCTTACTCGATGTGGTACCTGATCGACCCTGATCAAGACCATGGGATTGCATTCAATCATACAGATGCATC 864
      P Y S M W Y S I D P D Q D H G I A F N H T D A S

ACAAAGAGTGTGTTGGTCTGAACAGATGCTCCCGTTGCGCAATACTATTTCACCCACCCAAGATTAAAGTC 936
      Q R V F G P E P D A P V A Q Y Y F N P P K I K S

ATTTGTTCTTTCTGCGGAAAACCTTTAATGGTAACAAATTGACATTAAGTGATCATAGAGCCCTTTTCGGTAAC 1008
      F V L S A E N F N G N K L T L S D H R A L S V T

TGCTACTTTACAAAAGGGGACAGTAAATCATTTTTCCAATAGTGCAAGGTATGGGTTTATCACTGCTAT 1080
      A T L Q K G D S K I I F P I V Q G M G F I T A I

TTACGAGAATGCTAAACAGTTATTGCGTCACAAGTTGGTGTTCAGAGTTTAAAAACAGAACAGATTGG 1152
      Y E N A K P V I A S Q V G V Q E F K K Q N K I G

CAATTTTCAAAAATATACAGCCATGTTGTTTAAACCAAGTGACGTGGTCAATTTATTCTACTAATGAATTGAG 1224
      N F Q K Y T A M L F N Q V T W S I Y S T N E L S

TCTAAAGGATCCAAATCATATTGTTGGGAATGGACCAGGTATTATACAAATTGCTCGTGGTAATTCAAAGTA 1296
      L K D P N H I V G N G P G I I Q I A R G N S K Y
```

TTATGATGACACTGCAGGCGGTTATATTGACCATGCAGAATTGTCTGCCTCAGCAGATGGCGATAGGGGTGA 1368
Y D D T A G G Y I D H A E L S A S A D G D R G E

ATACAAATTTTCTTATCTATCAAAGGACAATCAAGATCAGGTAAACTCTTGTATGGGCACTTCCACATCA 1440
Y K F S Y S I K G Q S R S G K T L V W A L P H H

TCAAGAAGTGATCACTAATGTCAAACCAACAGATTAAATCTTGATTGCGCAACAAAAGGTGTAATGAAGTC 1512
Q E V I T N V K P T D L N L D S P T K G V M K S

ATATGTCACGAATGAGCTTGTATGCAAGAACAACCTTCCTGTCGATATTATGTGGGATCCATGGGCCACCTT 1584
Y V T N E L V M Q E Q L P V D I M W D P W A T F

TGCCACTAAAGCTAAGTATTCCAACAACGCTAAAGAAATCATTAAACAGGCTGCTATAGAAGAAGTCAAGCA 1656
A T K A K Y S N N A K E I I K Q A A I E E V K Q

AGACGTAGTAGGGATGGCCGATATTGATTGCGATGTATACTTCCGAAAAATCCTAGACAAATTGCTCACAT 1728
D V V G M A D I D S M Y T S G K I L D K F A H I

TGCATATGTTTGTCTTTCATATTACAAGATGAATCATTGACTAATGAAGTTGTTCTTAAACTTAAACAAGC 1800
A Y V C H F I L Q D E S L T N E V V P K L K Q A

AATTGAGATATTGCTCGAAATAAACAAAAATTCCCCTTGGTTTATGATTGTTCTTGGAAAGGGTTGATTTC 1872
I E I F A R N K Q K F P L V Y D C S W K G L I S

TTCAGCCGAACCAGGTGCTGATTTTGGTAATTCCAATTATAATGATCATCATTTCATTATGGATACACGT 1944
S A E P G A D F G N S N Y N D H H F H Y G Y H V

TCATGCCATTGCAATTTTATCACATATTGATCAAGATTGGCTTCATGCCAACACGATCTTATTTTCAATTA 2016
H A I A I L S H I D Q D W L H A N N D L I F N Y

TGCCAACACACTAATCAGAGACATTGCTAGTCCTCAAGCTGATCAATATTCCCACAATCCGATCATTTGA 2088
A N T L I R D I A S P Q A D Q Y F P Q F R S F D

TTTTTTCATGGTCACTCTTGGGCACATGGTATTTTCCCATCTGGTGATGGTAAAGATAATGAAAGTAGCAG 2160
F F H G H S W A H G I F P S G D G K D N E S S S

TGAAATGTATCATTTTCTGCTGCGCATTAATTAATATATGGTAATGTGATTGGTGATAAGAACATGCAACATCG 2232
E M Y H F A R A I K L Y G N V I G D K N M Q H R

AGGTGACTTGATGTTGGCAATTATGAAGCGGTGCGTCAATATGTATATGCTTTACACTAGAGACAACAAGAT 2304
G D L M L A I M K R S V N M Y M L Y T R D N K I

TCAACCGCCAAACTTTATTTGGCAACAAAGTATCGGGTATTCTATTTGAGAATAAAATCGATTATGCCACTTA 2367
Q P P N F I G N K V S G I L F E N K I D Y A T Y

TTTCGGGAGAGTACTATTGGAGATGAATGGATTGATGTTTATGTTGCCCATCACACCGGTGTCTTC 2448
F G R G T I G D E W I H G I H M L P I T P V S S

TTACTTTAGAAGCTCGAAATTGTTAAAGAAGAATGGGATGAAAAATTGGGTGCAATTGTCGACCAATCCC 2520
Y F R S S K F V K E E W D E K L G A I V D Q I P

AGATGGTTGGAAAGGTATTCTTATGCTCAATAAGGCATTATTCGACCCCAATCAGCTTGGGATTGGTTTGC 2592
D G W K G I L M L N K A L F D P K S A W D W F A

AAGAAAGGATTGGGATCCTGTATTAATTGATAATGGTATGTCTCGTACATGGTCCTTAGCATATATTGCAGG 2664
R K D W D P V L I D N G M S R T W S L A Y I A G

AATAATGAAGTGTGTGCTGTGGGTGTGGTTATGTATGTATAGACAGGAAGTAAATTCAATAAAAGTGTACC 2736
I M N -

CAAAGTACTAGATTTACTCATTGAGTTTGGCTTTTAAACATGTACAAATGTATCTCTGATTACTCGTATAT 2808
GAGACACACGAGATACTCATTGAAGTTAATTATTTATGACTGTTACCTGTAGATATTTTGTGCAACACTCC 2880
AGGAATCCACAAATGTAAACTTGTATAAAGATTGGTGAATACAGTCACGTGAAAATATTTTGTAGGGCTATA 2952
GCCCTACTATACGTGCTCTTGTACAAATTTTGGTGTGTCTTTTACTAGT 3005

Figura 30: Secuencia nucleotídica del gen *ENG2* y secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica.

En negrita se muestra la posible caja TATA. Sombreada se indica la supuesta señal cap. Subrayado y en negrita se señala el codon CTG que en *C. albicans* es traducido por serina.

6. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA PROTEICA CaEng2p.

El gen *ENG2* codifica un polipéptido de 734 aminoácidos (CaEng2p), con una masa molecular teórica de 83,057 Dalton y un punto isoelectrico teórico de 6,27, calculados ambos con el programa ProtParam (Bjellqvist *et al.* 1993; Bjellqvist *et al.* 1994). En el resto de la memoria y para simplificar, se citará la proteína CaEng2p como Eng2p. Sólo en caso de una posible confusión con las proteínas homólogas de otras levaduras se empleará CaEng2p.

Comparando la secuencia de Eng2p con la base de datos de familias proteicas y dominios PROSITE, se puede observar que la secuencia de aminoácidos muestra una región rica en residuos de prolina entre las posiciones 18 y 62, y tres posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones 94-96 (Asn-Leu-Thr), 126-128 (Asn-His-Thr) y 559-561 (Asn-Glu-Ser) (Figura 31A). Los aminoácidos más representados en la proteína, según el programa ProtParam, son Ile (8,0 %), Asp (7,2 %) y Ser, Ala y Lys (6.9%).

Según la predicción del servidor SignalP del CBS, no se ha encontrado ningún punto de corte que defina la existencia de alguna secuencia señal (Figura 31A).

El perfil hidropático de la proteína Eng2p, muestra una alternancia de dominios hidrofóbicos e hidrofílicos, con mayor predominio de estos últimos, como corresponde a una proteína globular soluble (Figura 31B). Se destaca la ausencia de un dominio marcadamente hidrofóbico en el extremo aminoterminal, característico de las secuencias señal de las proteínas que siguen la ruta típica de secreción.

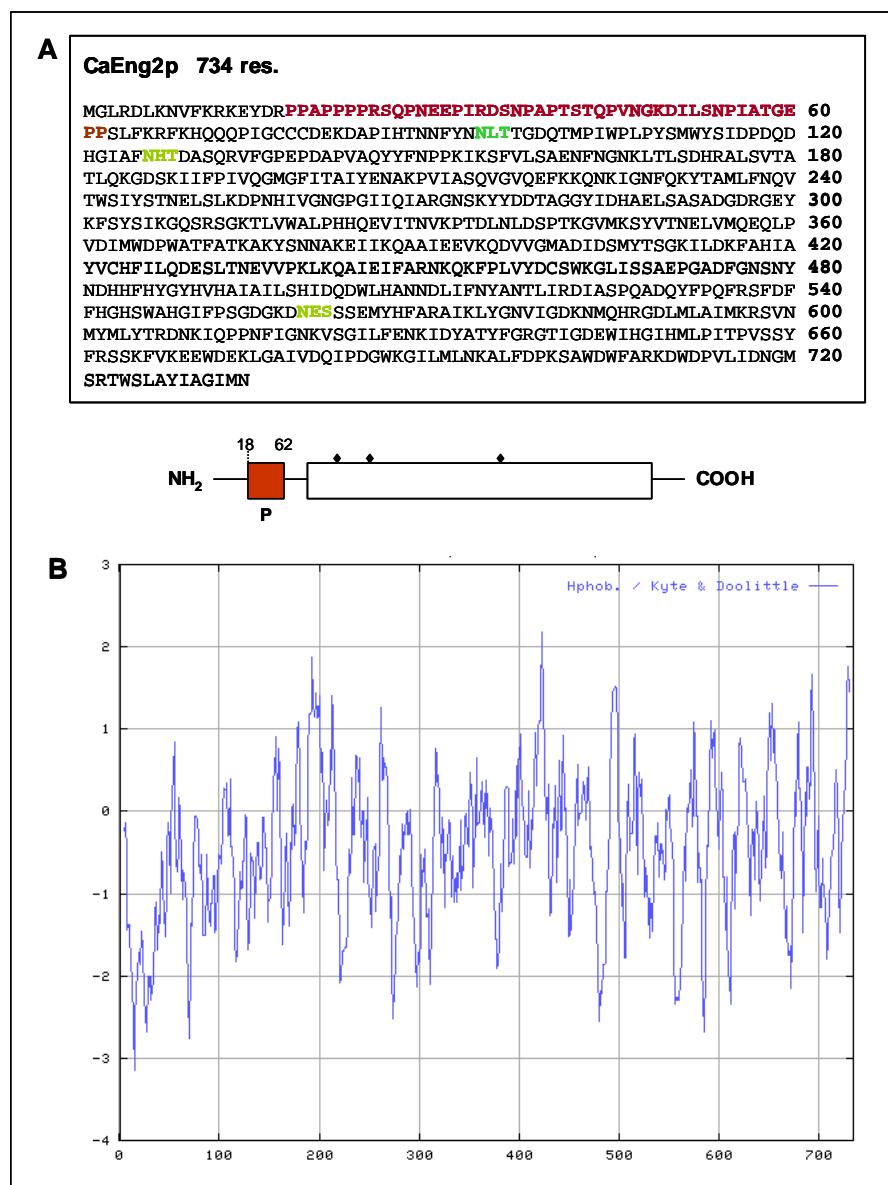


Figura 31: Características de la secuencia proteica Eng2p.

A) Secuencia y esquema de la proteína Eng2p en los que se señala una región rica en residuos de prolina (marrón) y las potenciales posiciones de N-glicosilación (verde en la secuencia y puntos negros en el esquema). B) Perfil hidropático de la proteína. Obtenido mediante el programa ProtScale Tool (<http://www.expasy.ch/tools/pscale/Hphob.Doolittle.html>), que representa la hidropaticidad de la secuencia proteica y permite predecir las regiones interiores y exteriores de la proteína usando el método de Kyte y Doolittle. En ordenadas se representa el índice hidropático de cada uno de los aminoácidos señalados en abscisas.

7. DELECIÓN DEL GEN *ENG2* EN *Candida albicans*. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS $\Delta eng1 \Delta eng2$.

La existencia de otra proteína con una posible actividad endoglucanasa nos hizo pensar que quizás ésta fuese la causa de la imposibilidad de detectar un fenotipo asociado al gen *ENG1*, probablemente por un problema de redundancia funcional. Esta hipótesis nos indujo a llevar a cabo la delección del gen *ENG2* en las cepas CAI4 y CNC64 ($\Delta eng1$), en un nuevo intento de comprender la función de este tipo de proteínas en la fisiología de *C. albicans*.

La estrategia seguida para la interrupción del gen *ENG2* es la ya descrita por Fonzi e Irwin (Fonzi and Irwin 1993), y que ha sido detallada con anterioridad en esta memoria.

A partir del gen *ENG2* completo y secuenciado (Dr. Francisco del Rey. Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca), se amplificó mediante PCR un fragmento que comprendía una zona anterior al marco abierto de lectura del gen y el inicio del mismo, introduciendo dos secuencias que fueran reconocidas por las enzimas de restricción *Xho* I y *Bam* HI en los extremos 5' y 3' de dicho fragmento amplificado (Figura 12. Materiales y Métodos). A continuación, este fragmento se subclonó en el vector pBluescript® SK(+/-) en el que previamente se había introducido otro fragmento que comprendía la región final del gen, concretamente desde el sitio de restricción *Bam* HI, y parte de la zona 3' adyacente hasta el punto de restricción *Spe* I. El plásmido resultante fue digerido con la enzima *Bam* HI para subclonar la casete de interrupción *hisG-URA3-hisG* de 4,03 kb. Empleando los sitios de restricción *Xho* I y *Spe* I se obtuvo la construcción de 4,9 kb empleada para deleccionar el gen *ENG2* (Figura 32). La integración de la misma en el genoma de *C. albicans* en las cepas CAI4 y CNC64 ($\Delta eng1$), originó los mutantes heterocigóticos CNC81 (*ENG2*/ $\Delta eng2::hisG-URA3-hisG$) y CNC85 (*ENG2*/ $\Delta eng2::hisG-URA3-hisG \Delta eng1$) respectivamente. La expulsión del gen *URA3* mediante recombinación homóloga de las dos copias del gen *hisG* y posterior selección en placas con 5-FOA, permitió el crecimiento de las cepas auxótrofas para uracilo CNC82 (*ENG2*/ $\Delta eng2::hisG$) y CNC86 (*ENG2*/ $\Delta eng2::hisG \Delta eng1$). A continuación se interrumpió, con la misma construcción, la segunda copia silvestre del gen *ENG2*, obteniéndose la cepa CNC87 ($\Delta eng2::hisG/\Delta eng2::hisG-URA3-hisG \Delta eng1$), que ha sido empleada en la caracterización fenotípica. Después de la expulsión del marcador *URA3* y posterior selección en 5-FOA, se originó la cepa CNC88 ($\Delta eng2::hisG/\Delta eng2::hisG \Delta eng1$). La comprobación de la correcta interrupción del gen *ENG2* se llevó a cabo mediante hibridación DNA-DNA (Figura 33).

En el proceso de interrupción de la segunda copia silvestre del gen *ENG2* en la cepa CNC82 (*ENG2*/ $\Delta eng2::hisG$), se obtuvieron numerosos transformantes. Tras el análisis de 56 transformantes, en ninguno de ellos se consiguió la delección de la segunda copia del gen.

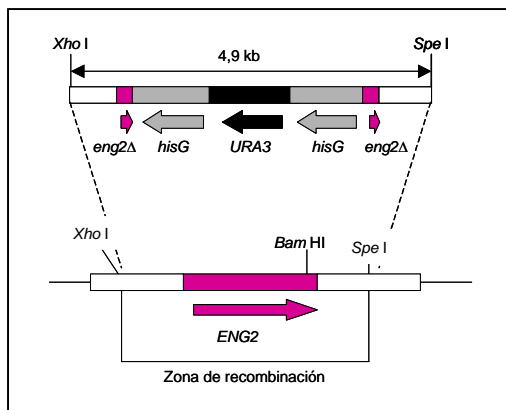


Figura 32:
Estrategia de
interrupción del
gen *ENG2*.

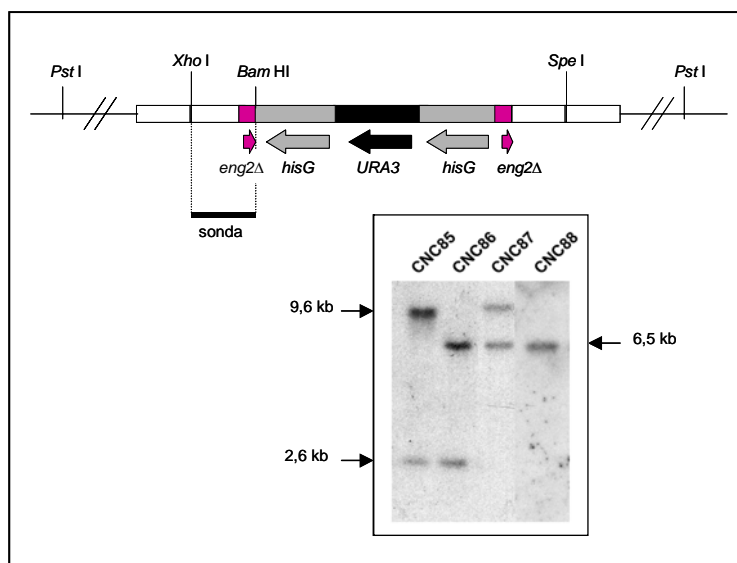


Figura 33: Comprobación de la interrupción del gen *ENG2* por hibridación DNA-DNA.

El DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Pst* I. La sonda empleada de 0,5 kb corresponde al fragmento *Xho* I-*Bam* HI amplificada por PCR para construir la casete de interrupción. La banda de 2,6 kb corresponde al locus silvestre del gen *CaENG2*, la de 9,6 kb al mismo locus deleciónado e interrumpido por la casete *hisG-URA3-hisG* y la de 6,5 kb al mismo locus interrumpido únicamente por *hisG*. Las flechas negras señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en kb. CNC85 (*ENG2/Δeng2::hisG-URA3-hisG Δeng1*), CNC86 (*ENG2/Δeng2::hisG Δeng1*), CNC87 (*Δeng2::hisG/Δeng2::hisG-URA3-hisG Δeng1*), CNC88 (*Δeng2::hisG/Δeng2::hisG Δeng1*).

8. INTERRUPCIÓN DEL GEN *XOG1* EN *Candida albicans*. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS $\Delta eng1 xog1$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$.

En *C. albicans* ha sido descrita una actividad exoglucanasa localizada en el periplasma de la célula (Cenamor *et al.* 1987), y que probablemente es debida a una proteína de 438 aminoácidos codificada por el gen *XOG1* (Chambers *et al.* 1993). El mutante nulo de esta exoglucanasa ha puesto de manifiesto que esta enzima no es esencial ni para el crecimiento ni para la transición morfológica del microorganismo, y solo se evidenciaron diferencias sutiles respecto de la sensibilidad a inhibidores de la síntesis de glucano y quitina (González Garcés *et al.* 1997).

Puesto que la construcción de este mutante nulo se llevó a cabo en nuestro laboratorio, consideramos interesante la delección del gen *XOG1*, tanto en un fondo $\Delta eng1$ como en un fondo $\Delta eng1 \Delta eng2$, para abordar desde otra perspectiva, el posible papel de *ENG1*, puesto que la delección única del mismo no nos había proporcionado demasiada información.

Hemos empleado la estrategia de disrupción ya descrita (González Garcés *et al.* 1997). El fragmento de 4,9 kb usado para interrumpir los dos alelos del gen fue obtenido tras digestión del plásmido pE1 con la enzima de restricción *Bst* XI (Figura 34). La recombinación homóloga de las zonas adyacentes a la cassette de interrupción *hisG-URA3-hisG* con el primer alelo silvestre en las cepas CNC64 ($\Delta eng1$) y CNC88 ($\Delta eng2 \Delta eng1$), originó los mutantes heterocigóticos CNC71 (*XOG1/xog1::hisG-URA3-hisG* $\Delta eng1$) y CNC91 (*XOG1/xog1::hisG-URA3-hisG* $\Delta eng2 \Delta eng1$) respectivamente. La expulsión del gen *URA3* mediante recombinación de las dos copias del gen *hisG* flanqueantes y la selección en placas con 5-FOA, permitió el crecimiento de las cepas auxótrofas para uracilo CNC72 (*XOG1/xog1::hisG* $\Delta eng1$) y CNC92 (*XOG1/xog1::hisG* $\Delta eng2 \Delta eng1$). Después de interrumpir la segunda copia silvestre del gen *XOG1* con la misma construcción de 4,9 kb, se obtuvieron las cepas CNC73 (*xog1::hisG-URA3-hisG/xog1::hisG* $\Delta eng1$) y CNC93 (*xog1::hisG-URA3-hisG/xog1::hisG* $\Delta eng2 \Delta eng1$) con las que se ha realizado la caracterización fenotípica que se describe en los próximos epígrafes. Tras expulsión del marcador *URA3* y posterior selección con 5-FOA, se originó la cepa CNC74 (*xog1::hisG/xog1::hisG* $\Delta eng1$).

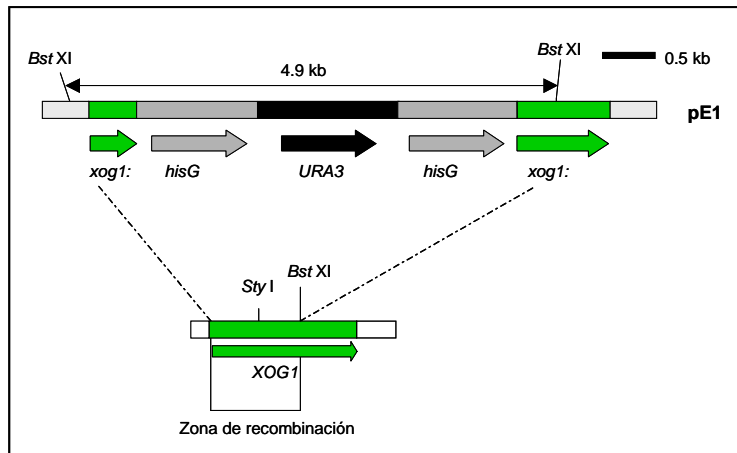


Figura 34: Estrategia de interrupción del gen *XOG1*.

Una primera aproximación al estudio de la correcta interrupción del primer alelo del gen *XOG1* y la subsecuente expulsión del gen *URA3*, se realizó mediante la técnica de PCR (Figuras 35 y 36). La interrupción del segundo alelo de *XOG1* pudo ser analizada fenotípicamente porque los mutantes nulos de este gen carecen de la capacidad de producir la hidrólisis del sustrato fluorogénico MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido) y por tanto, de liberar metilumbeliferona, compuesto que puede ser detectado por la fluorescencia emitida tras excitación con luz ultravioleta. Como consecuencia, las colonias de una cepa *xog1* no fluorescen (Figura 37).

En la figura 38 se puede observar la correcta interrupción del gen *XOG1* y posterior expulsión del gen *URA3* en las cepas CNC73 ($\Delta eng1 xog1 URA3+$) y CNC74 ($\Delta eng1 xog1 URA3-$), mediante hibridación DNA-DNA.

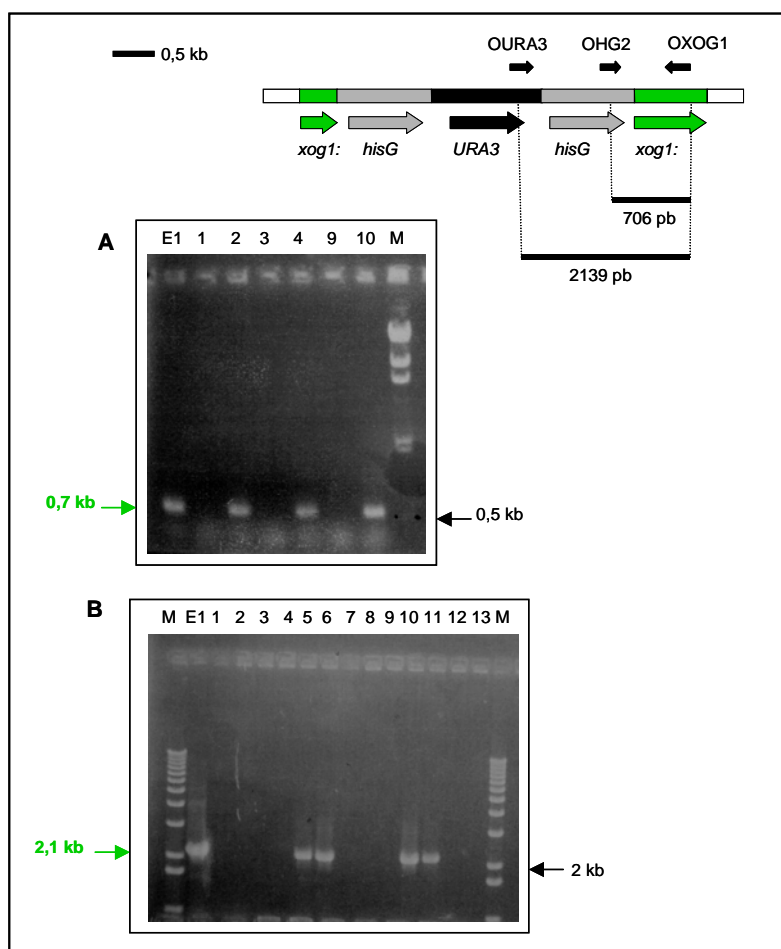


Figura 35: Comprobación mediante PCR de la interrupción del primer alelo del gen *XOG1*.

La correcta integración de la construcción de interrupción del gen *XOG1* se analizó con dos parejas de oligonucleótidos, *OHG2* y *OXOG1* que amplifican una banda de 706 pb, y *OURA3* y *OXOG1* que amplifican una banda de 2139 pb. *OHG2* hibrida en la posición +855 (desde el codon de inicio ATG del gen *hisG*). *OXOG1* hibrida en la posición +865 (desde el codon de inicio ATG del gen *XOG1*). *OURA3* hibrida a +1221 pb del codon de iniciación del gen *URA3*. A) E1: pE1 (control +), plásmido que lleva la construcción de interrupción. 1,2,3,4,9 y 10 son diferentes clones analizados con los oligos *OHG2*-*OXOG1*, procedentes de la interrupción del primer alelo *XOG1* en un fondo $\Delta eng1$. M: marcador de peso molecular de DNA (λ DNA.Hin dIII). B) M: marcador de peso molecular de DNA (1 kb Plus DNA Ladder). E1: pE1 (control +). 13 clones analizados con los oligos *OURA3*-*OXOG1*, provenientes de la interrupción del primer alelo *XOG1* en un fondo $\Delta eng1 \Delta eng2$.

Las flechas negras indican los marcadores de peso molecular y su tamaño. Las flechas verdes señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño.

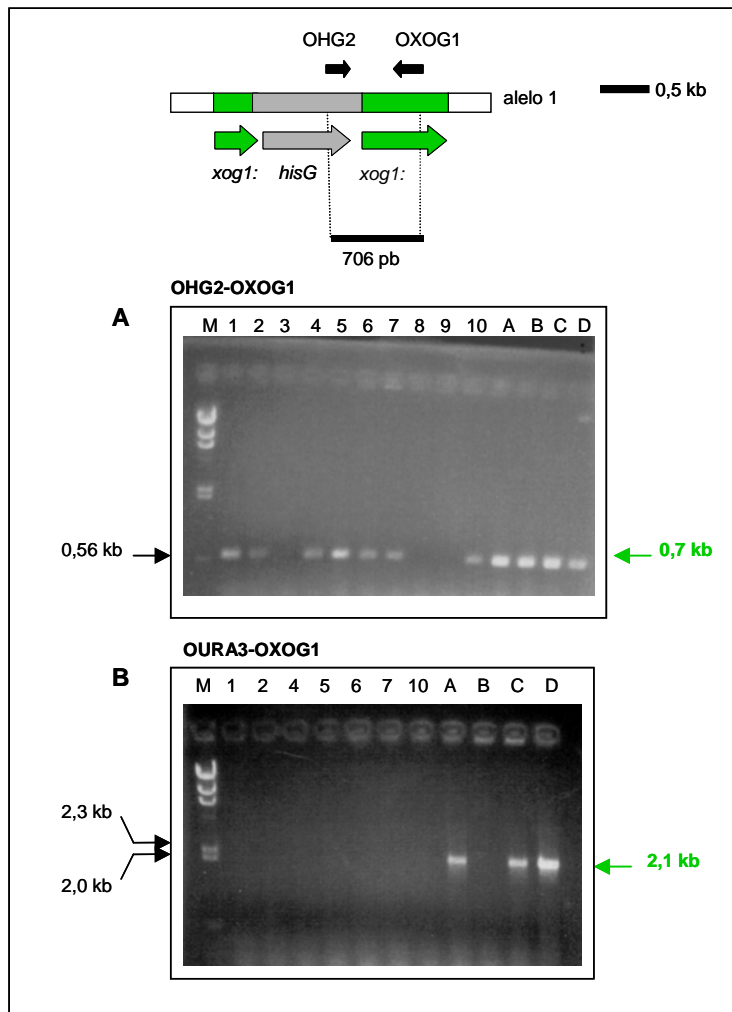


Figura 36: Comprobación mediante PCR de la expulsión del gen *URA3*.

La expulsión del marcador *URA3* se detectó mediante amplificación de la banda de 706 pb con los oligonucleótidos OHG2-OXOG1, a la par que la no amplificación de la banda de 2,1 kb con la pareja OURA3-OXOG1. Controles: A (*XOG1/xog1::hisG-URA3-hisG*), B (*XOG1/xog1::hisG*), C y D (*XOG1/xog1::hisG-URA3-hisG Δeng1*), que es la cepa huésped de la que derivan los diferentes transformantes analizados tras la expulsión del gen *URA3* y selección en 5-FOA. Marcador de peso molecular de DNA (M): λDNA.Hin dIII. A) 10 transformantes analizados con la pareja OHG2-OXOG1. B) 1,2,4,5,6,7 y 10, transformantes analizados con la pareja OURA3-OXOG1, en los que previamente se ha amplificado la banda de 0,7 kb.

Las flechas negras indican los marcadores de peso molecular y su tamaño. Las flechas verdes señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño.

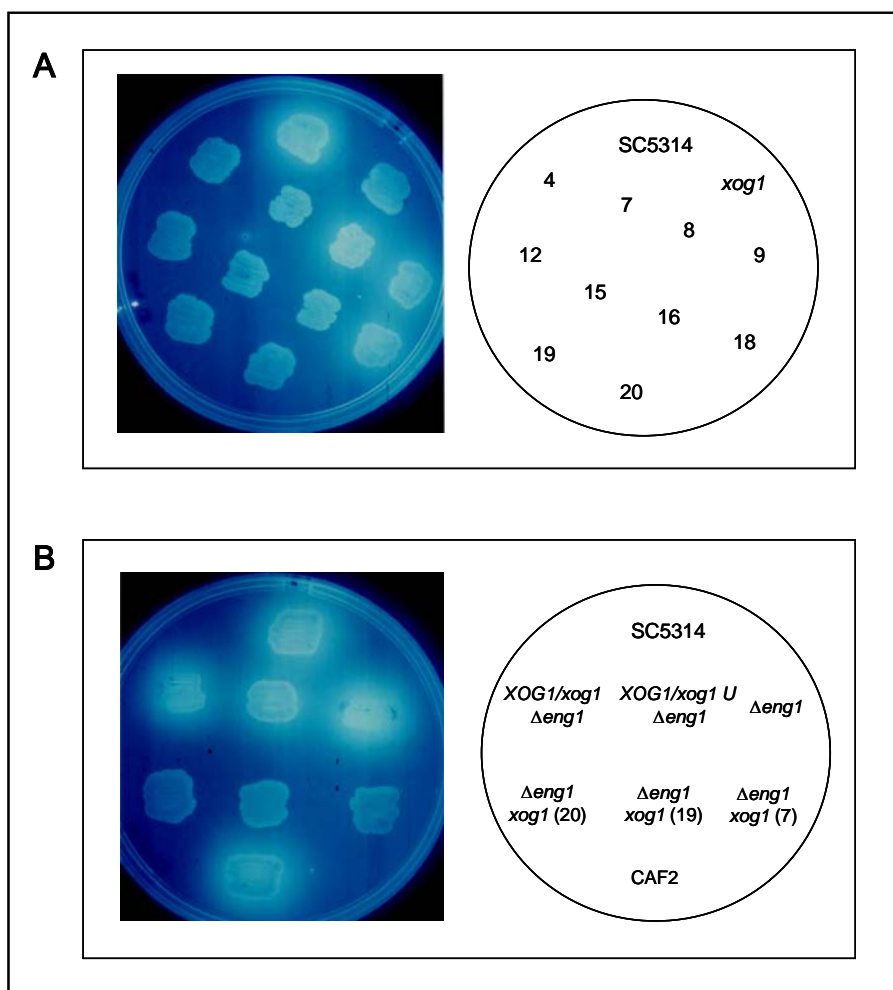


Figura 37: Comprobación de la interrupción del segundo alelo *XOG1* mediante observación de la hidrólisis de MUG.

A) Selección de transformantes que no hidrolizan MUG, correspondientes a la cepa $\Delta eng1$ *xog1*. SC5314 (control +), *xog1* (control negativo), 8,9 y 18 (transformantes que hidrolizan MUG), 4, 7, 12, 15, 16, 19 y 20 (transformantes que no hidrolizan MUG).

B) Actividad exoglucanasa de todas las cepas empleadas hasta obtener la cepa delecionada en *ENG1* y *XOG1* ($\Delta eng1$ *xog1*). SC5314 y CAF2 (controles +), $\Delta eng1$ (cepa huésped empleada para interrumpir el gen *XOG1*), *XOG1/xog1 U* $\Delta eng1$ (cepa derivada de la anterior con un alelo del gen *XOG1* interrumpido con la cassette *hisG-URA3-hisG*), *XOG1/xog1* $\Delta eng1$ (cepa derivada de la anterior en la que se ha expulsado el gen *URA3*), $\Delta eng1$ *xog1* (7) (19) (20): tres transformantes diferentes de la cepa delecionada en los genes *ENG1* y *XOG1*.

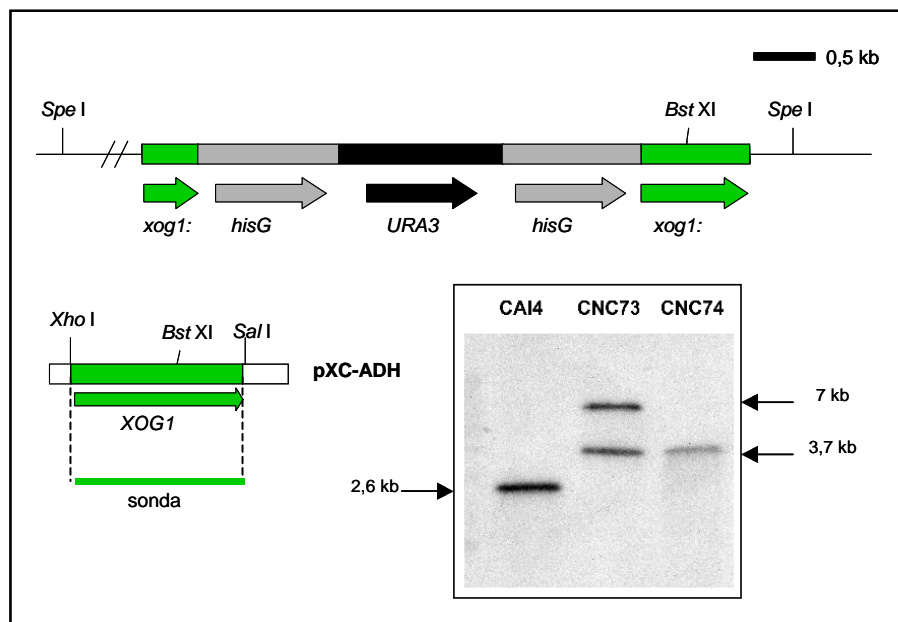


Figura 38: Comprobación de la interrupción del gen *XOG1* por hibridación DNA-DNA.

El DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Spe I*. La sonda empleada de 1,3 kb que comprende la totalidad del marco abierto de lectura del gen *XOG1*, equivale al fragmento *Xho I-Sal I* del plásmido *pXC-ADH* (Cid *et al.* 1994). La banda amplificada de 2,6 kb corresponde al locus silvestre del gen *XOG1*. La banda de 7 kb identifica el mismo locus interrumpido con la casete *hisG-URA3-hisG* y la banda de 3,7 kb corresponde al mismo locus interrumpido únicamente por *hisG*.

CAI4 (*ura*⁻), CNC73 (*xog1::hisG-URA3-hisG/xog1::hisG Δeng1*), CNC74 (*xog1::hisG/xog1::hisG Δeng1*).

9. REINTEGRACIÓN DEL GEN *ENG1* EN LA CEPA *Δeng1 xog1*.

Este tipo de controles son fundamentales en un microorganismo como *C. albicans*, ya que algunos pasos del método de disrupción génica son muy agresivos para la levadura, como por ejemplo el tratamiento con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), que pudiera generar procesos de recombinación que provocarían errores en la interpretación de los resultados obtenidos.

Para la reintegración de *ENG1* fue necesario amplificar el marco abierto de lectura, secuenciarlo en parte e introducirlo en un plásmido autorreplicativo de *C. albicans* con el marcador de selección *URA3* (Figura 13. Materiales y Métodos). La

Resultados

construcción obtenida se empleó para integrar *ENG1* en su *locus* en la cepa CNC74 ($\Delta eng1 xog1$), usando el sitio de restricción *Bgl* II (Figura 39). La cepa obtenida fue CNC75.

La integración correcta en el genoma se comprobó por PCR usando los oligonucleótidos INT.UPPER, que hibrida en una zona del genoma anterior al *locus* *ENG1* y por tanto, que no está en la construcción empleada en la integración, e INT.LOWER, que hibrida en la zona delecionada del gen *ENG1*. La banda de 1,5 kb que se amplifica, solo aparecería si *ENG1* se hubiera integrado correctamente en su *locus* (Figura 40).

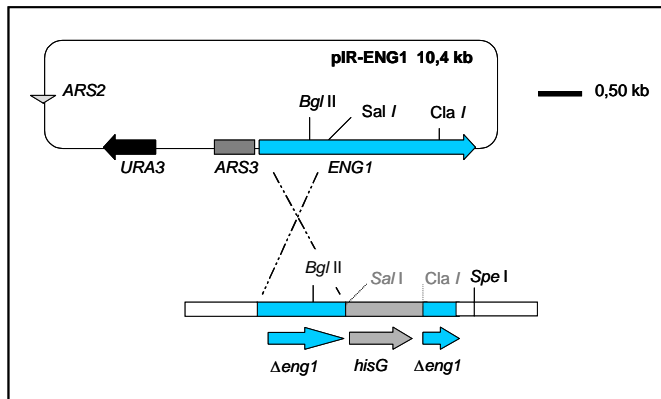


Figura 39:
Estrategia de
reintegración
del gen
ENG1.

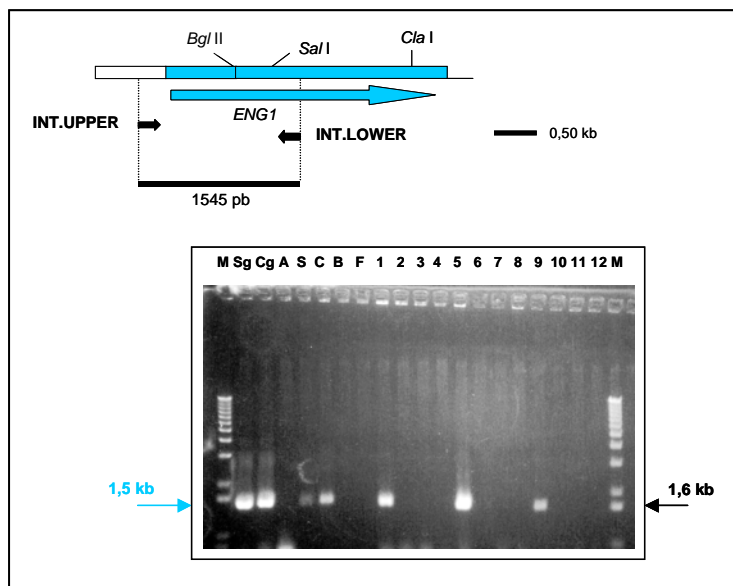


Figura 40: Comprobación mediante PCR de la reintegración del gen *ENG1*.

INT.UPPER híbrida en la posición -82 antes del codon de inicio del gen *ENG1*. INT.LOWER híbrida en la posición +1463 desde el codon de inicio ATG de dicho gen. Los experimentos de PCR se han llevado a cabo utilizando como molde el DNA liberado por células de una colonia de cada cepa a analizar, mediante tratamiento con zimoliasa a 37 °C durante 1 h. En los casos en los que se usa como molde DNA genómico extraído por lisis alcalina, se especifica.

M (marcador de peso molecular): 1 kb Plus DNA Ladder. Controles positivos: Sg, S (SC5314), Cg, C (CAF2). Controles negativos: A ($\Delta eng1\ xog1$), a partir de DNA genómico; B ($\Delta eng1$); F ($\Delta eng1\ xog1$). Transformantes analizados: 1-12.

La flecha negra indica el marcador de peso molecular y su tamaño. La flecha azul señala las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño.

Abreviaturas utilizadas: g = genómico extraído por lisis alcalina como DNA molde.

10. REINTEGRACIÓN DEL GEN *ENG1* BAJO EL PROMOTOR DE ACTINA, EN LA CEPA $\Delta eng1\ xog1$.

Como se verá más adelante en la descripción de los Resultados de esta tesis, la reintegración del gen *ENG1* en la cepa $\Delta eng1\ xog1$ permitió la recuperación de algunos fenotipos, pero no de todos, por este motivo se ha llevado a cabo la reintroducción de dicho gen bajo la regulación de un promotor fuerte (ver apartado 13.4.D de Resultados). Se decidió utilizar como promotor fuerte el promotor del gen de actina, *ACT1^{PR}* (Delbruck and Ernst 1993), que fue subclonado en el plásmido pRM1 (Pla *et al.* 1995) previa eliminación del fragmento que comprendía la secuencia autónoma de replicación *ARS3* de *C. albicans* (Herreros *et al.* 1992). El gen *ENG1* se introdujo en el plásmido resultante empleando el sitio de restricción *Sma* I (Figura 14. Materiales y Métodos). La construcción obtenida se integró en el locus del gen *LEU2* por recombinación homóloga sobre la cepa CNC74 ($\Delta eng1\ xog1$), usando el punto de corte *Kpn* I, originando así la cepa CNC76 (*LEU2/leu2::ACT1^{PR} ENG1 URA3 xog1::hisG/ xog1::hisG $\Delta eng1::hisG/\Delta eng1::hisG$*) (Figura 41).

La integración correcta en el genoma se determinó por PCR, amplificando la totalidad del gen *ENG1* (Figura 42).

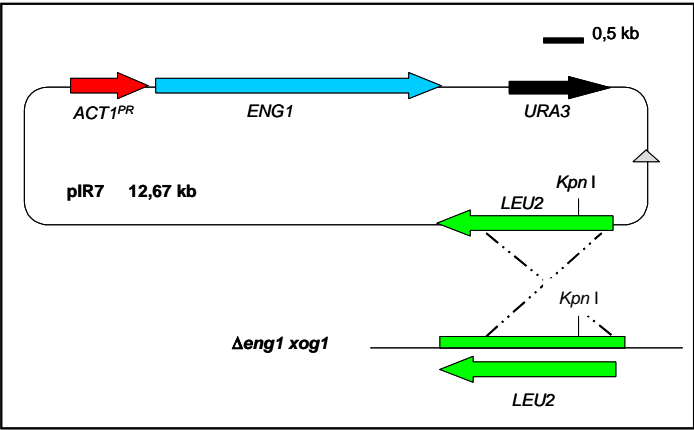


Figura 41: Reintegración del gen *ENG1* bajo el promotor de actina.

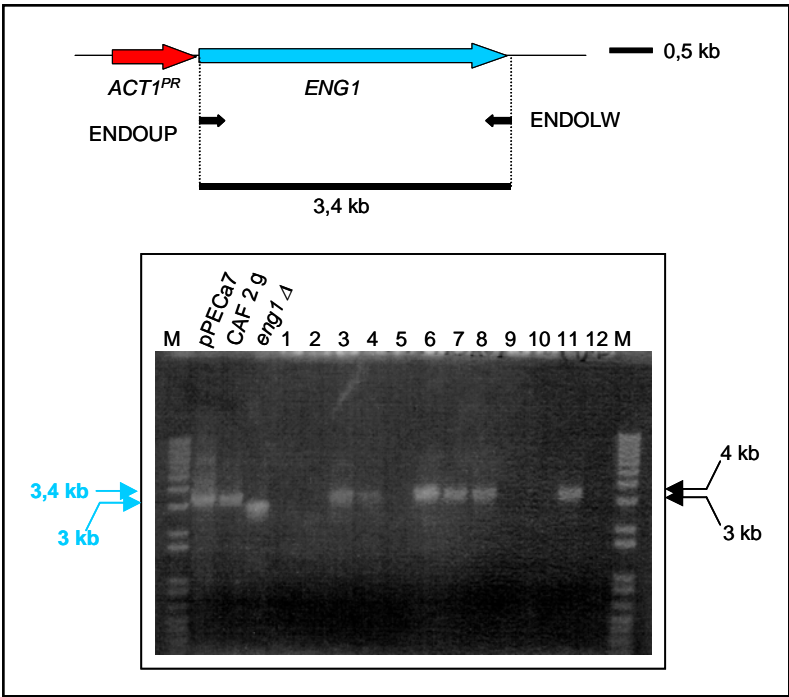


Figura 42: Comprobación mediante PCR de la reintegración de *ENG1*.

ENDOUP y ENDOLW amplifican el marco abierto de lectura del gen *ENG1*. La banda de 3,4 kb corresponde al gen silvestre. La banda de 3 kb corresponde al gen *ENG1* deletado e interrumpido con una copia del gen *hisG*.

Los experimentos de PCR se han llevado a cabo utilizando como molde el DNA liberado por células de una colonia de cada cepa a analizar por tratamiento con zimoliasa a 37 °C durante 1 h. En los casos en los que se usa como molde DNA genómico extraído por lisis alcalina, se especifica con una g.

M (marcador de peso molecular): 1 kb Plus DNA Ladder. Controles positivos: pPECa7 (plásmido con el gen *ENG1*) y CAF2. Control negativo: $\Delta eng1$ (CNC64). Transformantes analizados: 1-12.

Las flechas negras indican los marcadores de peso molecular y su tamaño en kb. Las flechas azules señalan las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño en kb.

11. REINTEGRACIÓN DEL GEN *ENG1* EN LA CEPA $\Delta eng1 \Delta eng2$.

Ya se ha citado anteriormente en esta memoria la dificultad de obtener un mutante deletado en el gen *ENG2*. Se pensó que quizás la delección de este gen podría ser letal para la levadura, aunque no lo fuese la delección conjunta de *ENG1* y *ENG2*. Para verificar esta hipótesis de trabajo, decidimos ver si era posible reintegrar el gen *ENG1*, en la cepa CNC88 ($\Delta eng1 \Delta eng2$).

La estrategia llevada a cabo ha sido la misma que en el caso de la integración de *ENG1* en la cepa $\Delta eng1 xog1$ (Figura 39). Empleando el sitio de restricción *Bgl* II, la construcción se integra en el genoma de la cepa CNC88, obteniéndose la cepa CNC89 ($\Delta eng1::hisG/ENG1 URA3 \Delta eng2::hisG/\Delta eng2::hisG$). La correcta integración en el locus de *ENG1* se comprobó por PCR (Figura 43). Este resultado sugiere que el gen *ENG2* no es esencial.

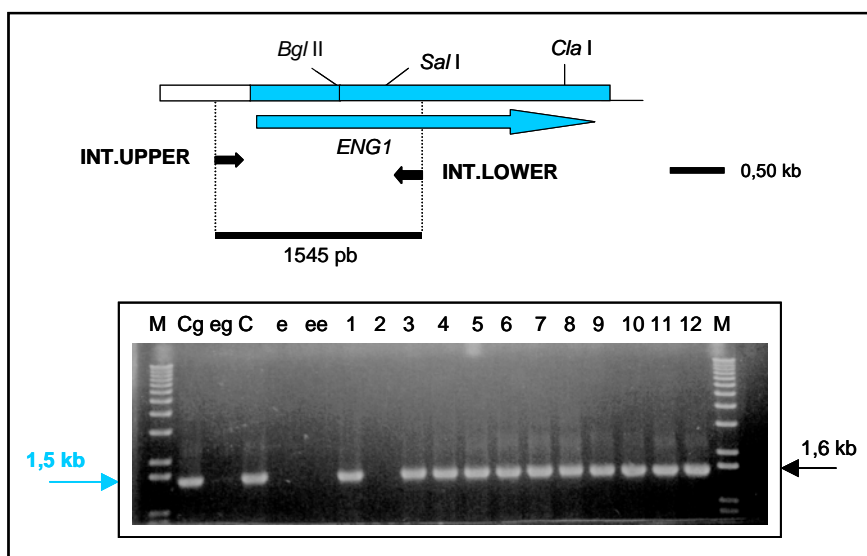


Figura 43: Comprobación por PCR de la integración de *ENG1*.

INT.UPPER hibrida en la posición -82 antes del codon de inicio del gen *ENG1*. INT.LOWER hibrida en la posición +1463 desde el codon de inicio ATG de dicho gen. Los experimentos de PCR se han llevado a cabo utilizando como molde el DNA liberado por células de una colonia de cada cepa a analizar por tratamiento con zimoliasa a 37 °C durante 1 h. En los casos en los que se usa como molde DNA genómico extraído por lisis alcalina, se especifica con una "g".

M (marcador de peso molecular): 1 kb Plus DNA Ladder. Control positivo: Cg, C (CAF2). Controles negativos: eg, e ($\Delta eng1$), ee ($\Delta eng1 \Delta eng2$). Transformantes analizados: 1-12.

La flecha negra indica el marcador de peso molecular y su tamaño. La flecha azul señala las bandas obtenidas y su correspondiente tamaño.

12. COMPARACIÓN DE *ENG1* Y *ENG2* CON OTRAS GLUCANASAS.

Hasta la fecha se han caracterizado varios genes que codifican para 1,3- β -glucanasas en levaduras, como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria.

Respecto a los genes objeto de estudio, *ENG1* y *ENG2*, las secuencias aminoacídicas no presentan ninguna homología significativa ni con las exo-1,3- β -glucanasas pertenecientes a la familia de las 5 glicosilhidrolasas, ni con

BGL2. Si presentan una elevada similitud con Eng1p y Eng2p de *S. cerevisiae*, con Eng1p de *A. fumigatus* (Nº de acceso: AAF13033), y con dos proteínas de *Schizosaccharomyces pombe* codificadas por los genes SPAC821.09 y SPAC23D3.10C. SPAC821.09, también llamado *eng3+*, codifica una proteína, citada como SpENG3p en esta memoria, de 1016 aminoácidos, localizada en el cromosoma I y que podría participar en el proceso de disolución del septo de glucano previo a la separación celular. SPAC23D3.10C o *eng2+*, codifica una proteína, citada como SpENG2p en esta memoria, de 706 aminoácidos, localizada en el cromosoma I de la levadura y que sería necesaria para que se complete con éxito la transición de crecimiento monopolar a bipolar (Vázquez de Aldana *et al.* 2000; Vázquez de Aldana *et al.* 2001).

Con respecto al grupo de las exo-1,3- β -glucanasas de levaduras anteriormente mencionadas, la única homología significativa de Eng1p y Eng2p, corresponde a algunos aminoácidos que son considerados como pertenecientes al centro activo y/o de unión al sustrato, el llamado “bloque de histidinas” D-H-H-H-Y, aunque con una ligera modificación al estar intercalada una fenilalanina entre la segunda y tercera histidina (D-H-H-F-H-Y).

En la figura 44 se muestra el alineamiento de diferentes endo-1,3- β -glucanasas de levaduras, realizado con el programa CLUSTALW 1.8. del BCM (*Baylor College of Medicine*) (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align.html>). Se puede observar la existencia de varias regiones con elevada similitud.

SpEng2p	1	-----
Eng1lp	1	-----
ScEng2p	1	-----
CaEng2p	1	-----
SpEng3p	1	-----
ScEng1p	1	-----MQLYLTLFLLSFVECSYISFISNNADEILETDLIETLSYATLT---
CaEng1p	1	MLFKSVLLSTLIAVQALAENLAHQEIVTVTKTTHISNPCLENYAKKLLPNNPTGLTTGIP
consensus	1	
SpEng2p	1	-----
Eng1lp	1	-----
ScEng2p	1	-----
CaEng2p	1	-----
SpEng3p	1	-----
ScEng1p	45	-----VGEFYVAQSVVTVRVSAASHSPLSVSPKNRVSPASPINSQSDSNTRTAVQLS
CaEng1p	61	IVIVYAPQQPDNQVKQSELLQPTQLSKAQQQQIQGSSVPASIHDTPTPTDHTKITVTST
consensus	61	
SpEng2p	1	-----
Eng1lp	1	-----
ScEng2p	1	-----
CaEng2p	1	-----
SpEng3p	1	-----
ScEng1p	97	LSLSNYASQVSQKISAQTNNDPVTVSNIYANDNSKSKSSVHNLSSVSGVASVMPASATMR
CaEng1p	121	TICNQKVCTVKTFSTIIISHSESPTTTTQNEEKSIADTKSFTHKALPSSNGAVTLKTT
consensus	121	

Resultados

```

SpEng2p      1  -----
Eng1lp      1  -----
ScEng2p     1  -----
CaEng2p     1  -----
SpEng3p     1  -----
ScEng1p    157 KVTLLSQTASTSTSTLFSSSLISGTQLNGTLLTSVSKGTIDPLVTQMPSYSSQETKII
CaEng1p    181 SVKTALTTTSTVFSATSLPSTTYTPSTSVSLVSTTKKNPVSSQSVVSTTKTISINTSLIT
consensus   181

SpEng2p      1  -----
Eng1lp      1  -----
ScEng2p     1  -----
CaEng2p     1  -----
SpEng3p     1  -----
ScEng1p    217 PSSLTSNKTIYITSVRTNAATATGEDSFIASTPASSTLFYPSNSTQDLVQTLASTTASPA
CaEng1p    241 DAVTITKEATTLPNSKHSSTFTNGSISFISTANKVKSTVTSDISNNSQNRSSLSTSTI
consensus   241

SpEng2p      1  -----MDVLVPIIYIGPIN-----
Eng1lp      1  -----MGIVSFLKPVVLANGQVFPVPSIGPN-----
ScEng2p     1  -----MCYSRQAIPPPVENRPGGTINRGPPPIPPRANVQPEVCSSENS-----
CaEng2p     1  -MGLRDLKNVFKRKEYDRPPAPPPPRSQPNNEPIRDSNPAPTSTQPVNGKDI-----
SpEng3p     1  -----MSSYLRSFIFGLLTISLAQCSPIIKDTKTKFSTGHNISL-----
ScEng1p    277 YPSNRTQITLSPSVSLYSTTSFIYPSNIENGSSPSPSLSTVSPVYPSSSTGNILLSSL
CaEng1p    301 DQLASITNSTLTITTKPTSLVDFSYTNSSRVSSTVRNSSSESSMVLEKSSSKLLSSTSS
consensus   301
               .      .      .      .      .

SpEng2p     14  -----P-----
Eng1lp     28  -----
ScEng2p    44  -----SKPRENRVAGESLRTPSSSNPLADSQVNSD
CaEng2p    52  -----LSN-----
SpEng3p    41  -----KKRDTN-----
ScEng1p   337 FSTVDSSSSPVSSSTLDTIYVSSSMQATISSSSSRQTKTSSSSSLSTSTSTATTENSST
CaEng1p   361 LNSSSIASSTTESSELASATTSDSSLSHSSSSSVELSSSLSEADSSSSSESVETGSSDET
consensus   361

SpEng2p     15  -----VFPSRAHPSPLGLTSNLFPIQTNKFYGNLYIGIRHNEISW
Eng1lp     28  -----SQDDWLEERSVNTDTPVETNKFYCGFLGLTQTNNTF
ScEng2p    74  NIFQS---PVLNLKAPPSVFNKVQHPVPKPNIDQSVDPLETNKFYDNNLLDDNTQPIW
CaEng2p    55  -----PIATGEPPSLFKRFKHQQQPIGCCCEKDAPHTNNFYNNLTTCQDTMPFIW
SpEng3p    47  --VFD---SVVDITNPASYFGTVSHPVTPAGVSTSLSSPIETNKFYDNNLLGSRITNEMY
ScEng1p   397 TTIVN---LFNAVSTDEPPTVFDRSPNPMSLADGVSNDCPIQTNKFYDNNLLGSCSEBAF
CaEng1p   421 ASNYSGDLFKAIDTNAPPTVFARSEIPLTIPAGVNNNGKPIQTNKFYDNNLLGNQDFMVI
consensus   421
               .      .      *  **.*  .....

SpEng2p     55  SHPYSVQWLNG---SYYGLAISHIIDSQRVFGPDPEVSP---CQYYFNPAGLYSIIISA
Eng1lp     65  THPYSVAVVKGGGTSQSYGMATSHVSNIVAHGPVNTAIPGSPISYYVNPIGIHSVITISA
ScEng2p   131  THPYSIWFSRD---PELFGLAANHTLASQRVFDTTNNPPR----FYFNPTNPKSFVEKA
CaEng2p   106  PLPYSMWMSID--PDQDHGIAFNHTDASQRVFGPEPDAPVA---QYYFNPPKIKSFVLSA
SpEng3p   102  ADPERYWWQSS---DMGGICHAHTDNQRVMDTDDTIPS-----YYEPIGICSLGFGA
ScEng1p   454  VYPYSLWKYTS---SSYGFAVQHTTVDCYSYGGYDSSGN---AEYLVNPLGIAHVVFSA
CaEng1p   481  PLPYGLYWSKT---SYGFAVQHNNVSDRVFGSINTNNKG-VASYFNPNTNNAELIFSA
consensus   481  *.....  . *.....  .      .....*  .....*

```

SpEng2p	109	REFAS--GNLISLDQSRHFSIQATLSAITS--GTTILPIVAGMGFVSGYYTN--LTPVFNS
Eng11p	125	SELGP--STVLTENPLPFSANAVLRPSASS--QSTITPVVQGMGFVTGIYSN--LQPKTQS
ScEng2p	183	REFVS--SNDIKLEFRDMKHMMSMCLLSLSS--QFIEFPLVQGMGFVTIYHD--LGFEIERS
CaEng2p	161	ENFN--GNKLTISDHRALSVTATLOKGD--K---IIFPILVQGMGFITAIYEN--AKFVIAS
SpEng3p	154	SGITS--NTDPIVDEIDQMSARFTFSWDSS--MQLITIEGMAVTTAVYTN--AIPQIFS
ScEng1p	507	SNFDS--SMTVOVDEMTLSSTRVVLSESNDS--NYLEIPLVQGMGFATGIYHGSINAKTGS
CaEng1p	536	ISFKSDSMHMKVQSMAELSALVTLSSSSNDES--YDIPLVQGMGFVTGIYNGNLTPLNS
consensus	541 * ** * *
SpEng2p	166	SILFSS--TKINFSRG---YKYRIQLTDGKIWFYAFPTSSSSTFNLTLASNSQLTTSTK
Eng11p	182	GVEFTKIVTAGSPRTGI--FKYSLIEDGTSWLYATPDDGSDPQ--LQLASNSEIIGFAG
ScEng2p	240	AVGFRSLERISVNER--Y--GKYNIOLENNRNWILYLTSPDYSFPQDFQISLDSNTIIS
CaEng2p	214	QVGVEFKKQNKIGN--F--QKYTAMLFNQTWSTYST-----NELSKDPNHIVCN
SpEng3p	208	STLYINDFVEVPGTSAV--QKYRVTMSDNHVWLYIYIG---DSLTLTESTSQMLVGSNT
ScEng1p	565	SYGFNTIVSESSNLAQGILKYRITLLNGVTWLYVIGPDDLSTDFSLVSSSEYEIKAS
CaEng1p	596	LFGVKDSLSTSDALLSNVLKYRATLLNNVQWLYVYVTLPD--KDTDFKLEVEDFYNKGS
consensus	601 ** *
SpEng2p	222	FTGLIQICKVPNESVNNSYP--TIYDASAGVYTTISLSAQ--VSCITGGEYWFREIATAGYTN
Eng11p	239	WSCTIQAKNPACASG---EKFYDNSSGVYAVEGAVMGS--VSESTGYSLMMAKAGKDA
ScEng2p	297	HKINGLICQLSADSVP-----SID-MAAGCYPVYCDLSQQTVEHFTNYRFNYTVAGYSQ
CaEng2p	262	GGIILQIARGNSKYD-----DTAGGYIDHAELSAS--ADGDRGEBYKFSYSIKGOSR
SpEng3p	262	FNGYIQAIAKIPLCDGT--AALALDYIAGVYITGISISGY--VEDAVGYYSFDETTAGDTS
ScEng1p	625	ASVDGLHIIQLAVAPSET--DYEVFYDQAAGMYVTNFKLQCV--SDGSTAIYEFSYTTQGESA
CaEng1p	654	KPVDGLHIIQVAIAPEDN--DNKYIDAAGMYVTGATVLCGSVSQCTAASIKFSYTTACKSS
consensus	661 * * * *
SpEng2p	281	LNP--LMFALPHHMQSFGSDTQAYKTGLGLASTTMGIMFAYAKTWHLIEKNLPTQVGF
Eng11p	294	QNTPLLMLFALPHHMSFDASTQSRATNITLRTITTKQATAVIGEYWTMVEPELPISMGFA
ScEng2p	351	SGTT--LMYALPHHKAFTPEMQEREIASLSDSTVKGLMTGYLTN--SFDQVQVPOELGFE
CaEng2p	312	SGKT--LMYALPHHQQEVIITN--VKPIDLNLDSPTKGVMSYVTN--ELVMQEQLPVDIMWD
SpEng3p	318	VEP--LEFLLPHQVDTAVSG--TKVTSIVLASLVSGDMNAAAGN--SITFAEALPDIGFL
ScEng1p	683	SGST--MIFALPHHESFSDIMQDYITGICLASTTKGVMMGYLT--SLQFSTSLNRQISWL
CaEng1p	713	SNNP--LVFALPHHMSLTGSALDALTGITVITSTTKGEMTGFLT--ELFSETLNQDVEFL
consensus	721 ** *
SpEng2p	339	PIPWNGC--SNTYSPTALAAIRAACATDINF--DVVNASNLDSMYTSGKIVAMYAQVCHVA
Eng11p	354	PWSVSGS--IDKISPAAQVILAAAPTELQ--DMDAQINLNSMYFSGKALSKEATLITYTV
ScEng2p	409	PVALSLNK--KADYSQEKLSKIREAAVQEVQLSDPQQESNIDSMYFSGKILAKYAWILYVT
CaEng2p	367	PWATFT--KAKYSNNAKELIKQAALIEVKQ--DVVGMADIDSMYTSGKILDKAHTIAYVC
SpEng3p	373	PWSPTGC--QIGYSEBALELIAEVAGTELGE--DFSANSNLNSMYYSGKVLAKYAMLCVTH
ScEng1p	741	PWSSQLCSNLLEYSKQLQLLAEVANSELQVSISESISGLNTYVLG--KVIDKYSYILLTV
CaEng1p	771	PWTENMTG--SLTYTKQCLELLASAANKELAADIAATVKNMNSNYFSGKVLDKYAQILLVV
consensus	781	* * * * *
SpEng2p	396	SRILGDSLTNTGLTKLKQAMARFTTNTQMYPLVYDTTYKGIISTAGYSS--PLADYGNT
Eng11p	412	DRIGGSNTLAAEGLARLKQSFARFTDNROQFPLVDNVWKGVSASASYATGDVGFADFGNT
ScEng2p	468	HYILHDENLTKELLKLTIAMERFISNQVPLPLNYDVSWKGIISSESSSQ-----DFGNS
CaEng2p	424	HFIQLDESILNEVVPKLLQALEIFARNKKEPLVYDCSWKGLISSAEPGA-----DFGNS
SpEng3p	430	NDILGDETSSEQCICQKLEAAAFARFVDNQCTYPLTYDNWKGVSVAAGLSG--DSLADFGNS
ScEng1p	800	SEIIQDBASTKSTLENKSAFDILQNECTYPLTYDTKENGLVSSGDWGSTSTQYDFGNT
CaEng1p	830	SEIIQDEEVTKALANAKDKARKVFTQNKQYPLMYDTKEGGVTSSTAQDG--DPNADFGSA
consensus	841 * * * *

Resultados

[illegible]

SpEng2p		-----
Eng1lp		-----
ScEng2p		-----
CaEng2p		-----
SpEng3p	834	DNGALGPVQSSSTTSSITPTPTTSSITPTPTTSTTTTAQSTGMQLCGSNYYDASSYYC
ScEng1p		-----
CaEng1p		-----
consensus	1261	
SpEng2p		-----
Eng1lp		-----
ScEng2p		-----
CaEng2p		-----
SpEng3p	894	DNDQLCP IIDGV DYLSCNGACYNPSQYVCS DGLSPNTVTTTKATTTFTPTPTTTTPTP
ScEng1p		-----
CaEng1p		-----
consensus	1321	
SpEng2p		-----
Eng1lp		-----
ScEng2p		-----
CaEng2p		-----
SpEng3p	954	TTTSATSTNVIAQCGSAWYDSQSYICYGNILCPI INGSPLLACGNACYDSSIYGCSNGAL
ScEng1p		-----
CaEng1p		-----
consensus	1381	
SpEng2p		---
Eng1lp		---
ScEng2p		---
CaEng2p		---
SpEng3p	1014	VAA
ScEng1p		---
CaEng1p		---
consensus	1441	

Figura 44: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CaEng1p, CaEng2p, ScEng1p, ScEng2p, SpEng3p, SpEng2p y Eng1lp.

Con asteriscos (*) se indican los residuos idénticos y con puntos (.) las sustituciones conservativas. Sombreado en negro aparecen las zonas de residuos idénticos y sombreado en gris las regiones de aminoácidos conservados. Se señala subrayado y en rojo el motivo D-H-H-F-H-Y.

En la figura 45 se presenta el porcentaje de similitud estimado entre Eng1p y cada una de las endo-1,3- β -glucanasas de levaduras. El cálculo del mismo se ha llevado a cabo comparando la secuencia completa de aminoácidos y teniendo en cuenta la zona en la que dos secuencias son alineadas. Se puede observar que la proteína con mayor similitud a Eng1p es ScEng1p, con un 45 % de identidad. Las dos proteínas de *C. albicans*, Eng1p y Eng2p, presentan un 40 % de identidad. Eng1p comparte un 38 %

Resultados

de identidad con la proteína Eng2p de *S. cerevisiae*, un 40 % con la única endo-1,3- β -glucanasa descrita hasta el momento en *A. fumigatus* y un 39 % y 37 % con Eng2p y Eng3p de *S. pombe*, respectivamente.

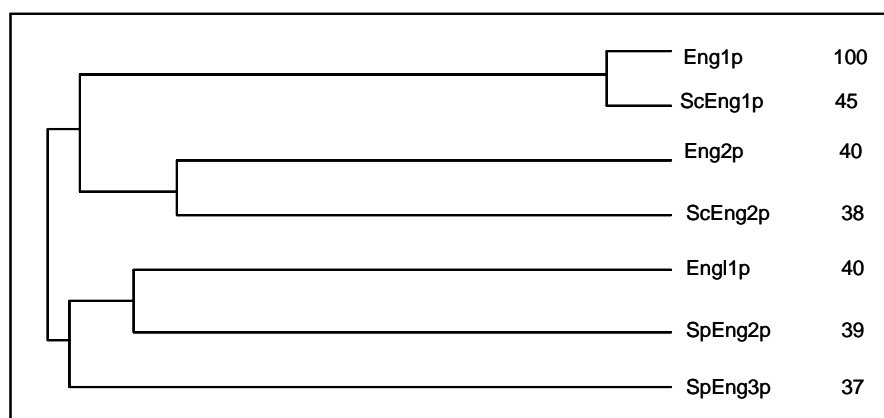


Figura 45: Dendrograma del alineamiento de diferentes 1,3- β -endoglucanasas de levaduras.

Los números indican el porcentaje de similitud entre Eng1p de *C. albicans* y cada una de las otras proteínas citadas. El porcentaje de identidad se ha calculado mediante el alineamiento de las secuencias con el programa BLAST 2 del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>).

Estudiando las características de secuencia de cada proteína, y comparándolas entre sí, se han observado una serie de rasgos comunes que se plasman en la figura 46. Las secuencias de ScEng1p, CaEng1p, SpEng3p y Eng1p presentan un posible péptido señal de entre 16 y 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, característico de aquellas proteínas que son translocadas al retículo endoplásmico. ScEng1p, CaEng1p y SpEng3p muestran una zona rica en serinas y treoninas, típico de las proteínas que se secretan al exterior celular, y que en el caso de *S. cerevisiae* y *C. albicans* se localiza en el extremo aminoterminal de la proteína, y en el caso de *S. pombe*, se encuentra en el extremo carboxilo. Las proteínas Eng2p de *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *S. pombe*, no exhiben en su secuencia ni el posible péptido señal, ni la zona rica en serinas y treoninas. Como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, ScEng2p ha sido también identificado como ACF2 o PCA1, un factor que interviene en el proceso de polimerización de actina y que se ha visto en células de levadura permeabilizadas (Lechler and Li 1997). Esta proteína muestra, en el extremo N-terminal, dos secuencias ricas en prolina que serían posibles dominios SH3, y en el extremo C-terminal parece poseer dos dominios tipo "pleckstrin" (PH), dominio que aparece en proteínas eucarióticas implicadas en señalización intracelular, o proteínas que son componentes

del citoesqueleto, pero cuya función es aún poco conocida (Gibson *et al.* 1994). La secuencia CaEng2p también presenta las dos regiones ricas en prolina en el extremo aminoterminal de la proteína. El motivo NEP, el más conservado en las hidrolasas de glucano pertenecientes a la familia 5, no aparece en ninguna de las endoglucanasas caracterizadas, como ya fue descrito para las de *S. cerevisiae* (Baladrón García 1997), estando sustituido por el triplete NXQ, siendo el residuo central glutámico para ScEng1p, glutamina en el caso de ScEng2p y SpEng3p, triptófano para SpEng2p, arginina para Eng1p y lisina para las dos endoglucanasas de *C. albicans*. La mayor identidad entre las diferentes proteínas se da en el bloque de histidinas, con dos excepciones, la tirosina aparece reemplazada por un triptófano en SpEng2p y la segunda histidina que se encuentra conservada en todas la glucanasas de la familia 5, está sustituida por un residuo de ácido aspártico en CaEng1p (Figura 46).

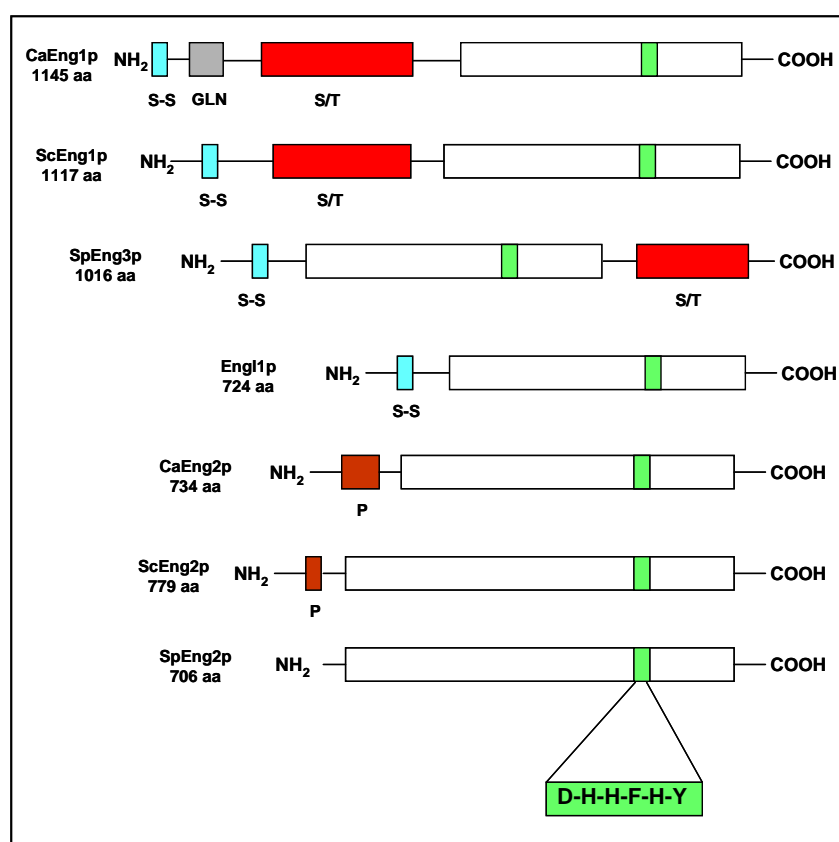


Figura 46: Dominios de las endo-β-1,3-glucanasas.

Posible secuencia señal (azul), región rica en residuos de glutamina (gris), zona rica en serinas y treoninas (rojo), extensión con abundancia de residuos de prolina (marrón), supuesto dominio que interviene en el centro activo (D-H-H-F-H-Y) (verde).

Hay que destacar que CaEng1p y CaEng2p también presentan similitud, aunque en menor grado (24-26% de identidad y 42% de similitud), con otras proteínas como la descrita con el N° de acceso: D78510.1 de la planta de soja, que codifica una proteína de 668 aminoácidos de la membrana plasmática que interacciona con un compuesto de β -glucano de la pared celular del hongo fitopatógeno *Phytophthora megasperma* f. Sp. *glycinea* (Umemoto *et al.* 1997); con una presunta proteína de 745 aminoácidos de la planta *Arabidopsis thaliana* (N° de acceso: F1N13_10); una proteína de 662 aminoácidos de *Phaseolus vulgaris* que se une al β -glucano (N° de acceso: AF088188), y una proteína desconocida de 1020 aminoácidos de *Bacillus halodurans* (N° de acceso: AP001507). Todas estas proteínas tienen en común la secuencia del bloque de histidinas, que en todos los casos es como el de las α -1,3-glucanasas, D-H-H-H-Y, excepto en la proteína de *B. halodurans*, que lleva la fenilalanina intercalada entre la segunda y tercera histidina.

Es de destacar, por último, que existen otras proteínas que presentan poca similitud con CaEng1p pero que comparten con ella la zona rica en serinas y treoninas, como ha sido el caso de *HWP1* (proteína de la pared celular de *C. albicans* que aparece solo en la forma hifal), *HKR1* (proteína de la pared celular de *S. cerevisiae* responsable de la resistencia a la toxina killer de *Hansenula mrakii*), *FLO1* y *FLO8* (involucradas en floculación), *MBS2* (posible proteína integral de membrana) y otras de diferente naturaleza.

13. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES $\Delta eng1$ *xog1*, $\Delta eng1 \Delta eng2$, y $\Delta eng1 \Delta eng2$ *xog1*.

Tras la delección de *ENG1* y *ENG2* y la interrupción de *XOG1* para obtener los diversos mutantes, se procedió a un estudio fenotípico de los mismos con el fin de comprobar si la eliminación conjunta de estas proteínas afectaba al crecimiento normal de la levadura, a la transición morfológica, a la virulencia o a la correcta arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.

Para la caracterización fenotípica de los distintos mutantes, se eligieron las correspondientes cepas protótrofas para uracilo con el objeto de minimizar la influencia del fondo genético Ura- en el fenotipo estudiado (Navarro-García *et al.* 1995). Como cepa control de los experimentos se ha empleado la cepa CAF2 ($\Delta ura3::\lambda imm434/URA3$), como ya ha sido comentado con anterioridad en esta memoria.

13.1. Capacidad de crecimiento en medio líquido y morfología celular.

Durante el proceso de obtención de los distintos mutantes se había observado que dichas cepas, aparentemente, crecían de forma semejante a la cepa CAF2. No obstante, se realizó un seguimiento del crecimiento midiendo la D.O. de los cultivos a una absorbancia de 620 nm a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas del inicio del estudio, tanto en medio rico, YPD, como en un medio pobre, MM suplementado con aminoácidos.

El tiempo medio de generación estimado (85 min. en YPD y 110 min. en MM) y la densidad óptica final alcanzada en fase estacionaria (13 unidades en medio rico y 4,5 unidades en medio mínimo), es similar para la cepa control CAF2 y para las cepas mutantes analizadas (Figura 47). Por tanto, podemos concluir que *ENG1*, *ENG2* y *XOG1* son dispensables para el crecimiento de *C. albicans* en las condiciones ensayadas.

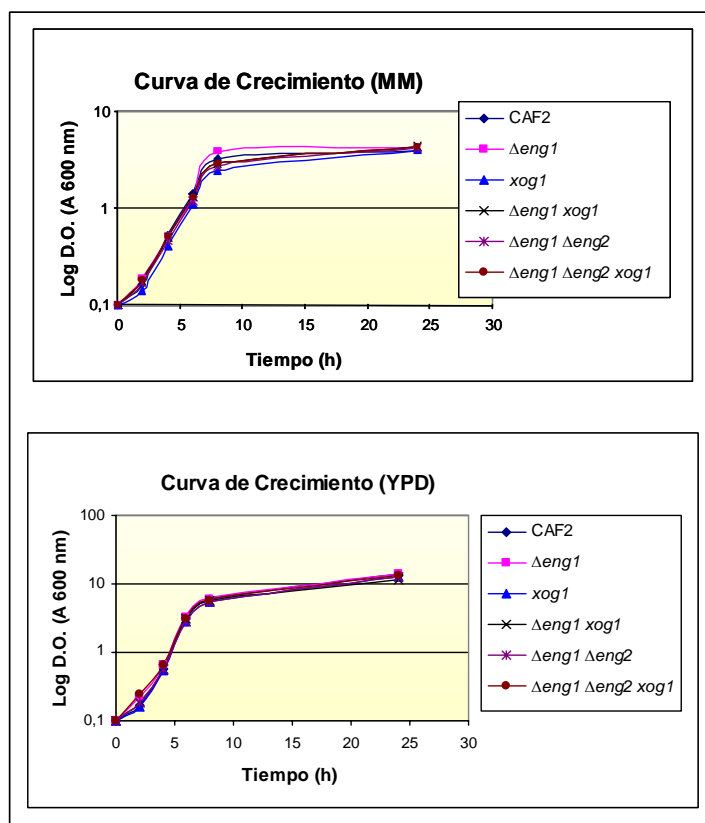


Figura 47: Curvas de crecimiento en medio líquido.

13.2. Estudio de la transición morfológica.

A) Filamentación en STF.

La primera aproximación experimental empleada para estudiar la transición morfológica en *C. albicans*, fue realizar un seguimiento del comportamiento de las distintas cepas mutantes empleando un factor inductor de dicha transición, como es la

Resultados

presencia de suero en el medio de cultivo. Se utilizaron diversas concentraciones de suero de ternera fetal (STF) para comprobar si existían diferencias en el grado de inducción de la transición morfológica que se pudieran evidenciar en condiciones limitantes de suero.

El seguimiento del fenómeno de filamentación de las diversas cepas, se realizó mediante observación microscópica, y se tomaron fotografías a diferentes tiempos (2, 5 y 24 horas) tras la inoculación en el medio inductor. A las dos horas del ensayo se pueden observar los tubos germinativos emitidos por las levaduras (Figura 48). A las 5 horas de incubación a 37° C se pueden observar largos filamentos, de mayor longitud a medida que aumenta la concentración de STF en el medio. Las fotografías tomadas tras 24 horas de incubación ponen de manifiesto la existencia de voluminosos agregados de filamentos, especialmente en 100 % de STF junto a numerosas blastosporas que se forman a partir de los filamentos después de periodos largos de incubación en este medio. En la figura 48 se expone una fotografía representativa de la morfología celular observada a cada tiempo ensayado y con las diferentes condiciones utilizadas, porque no se han detectado diferencias significativas entre la cepa CAF2 y las cepas mutantes analizadas. Por tanto, la delección de los genes *ENG1*, *ENG2* y *XOG1* no afecta de forma relevante a la transición levadura-micelio en las condiciones ensayadas.

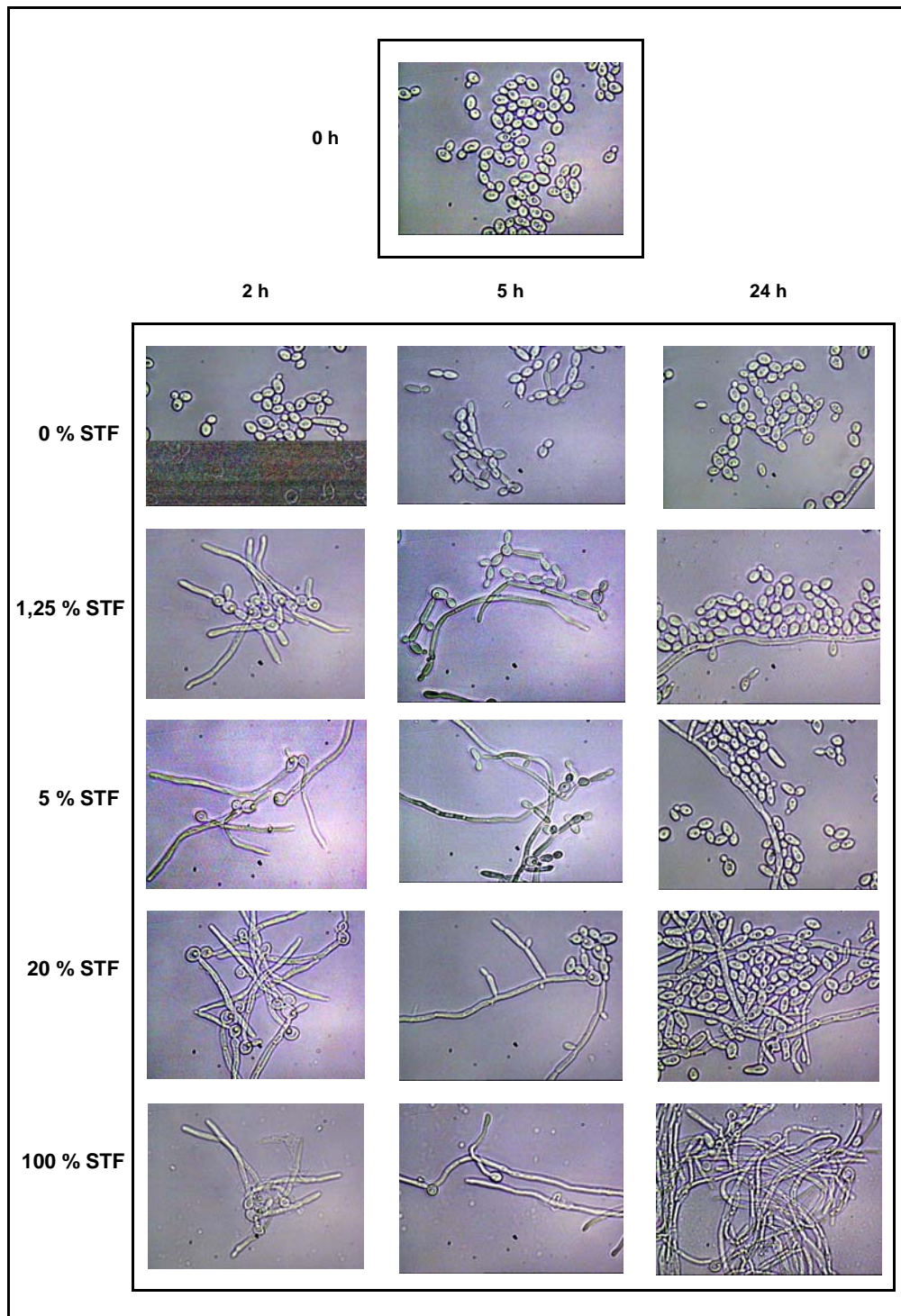


Figura 48: Transición morfológica en medio líquido con STF.

B) Morfología colonial, e invasividad en placa.

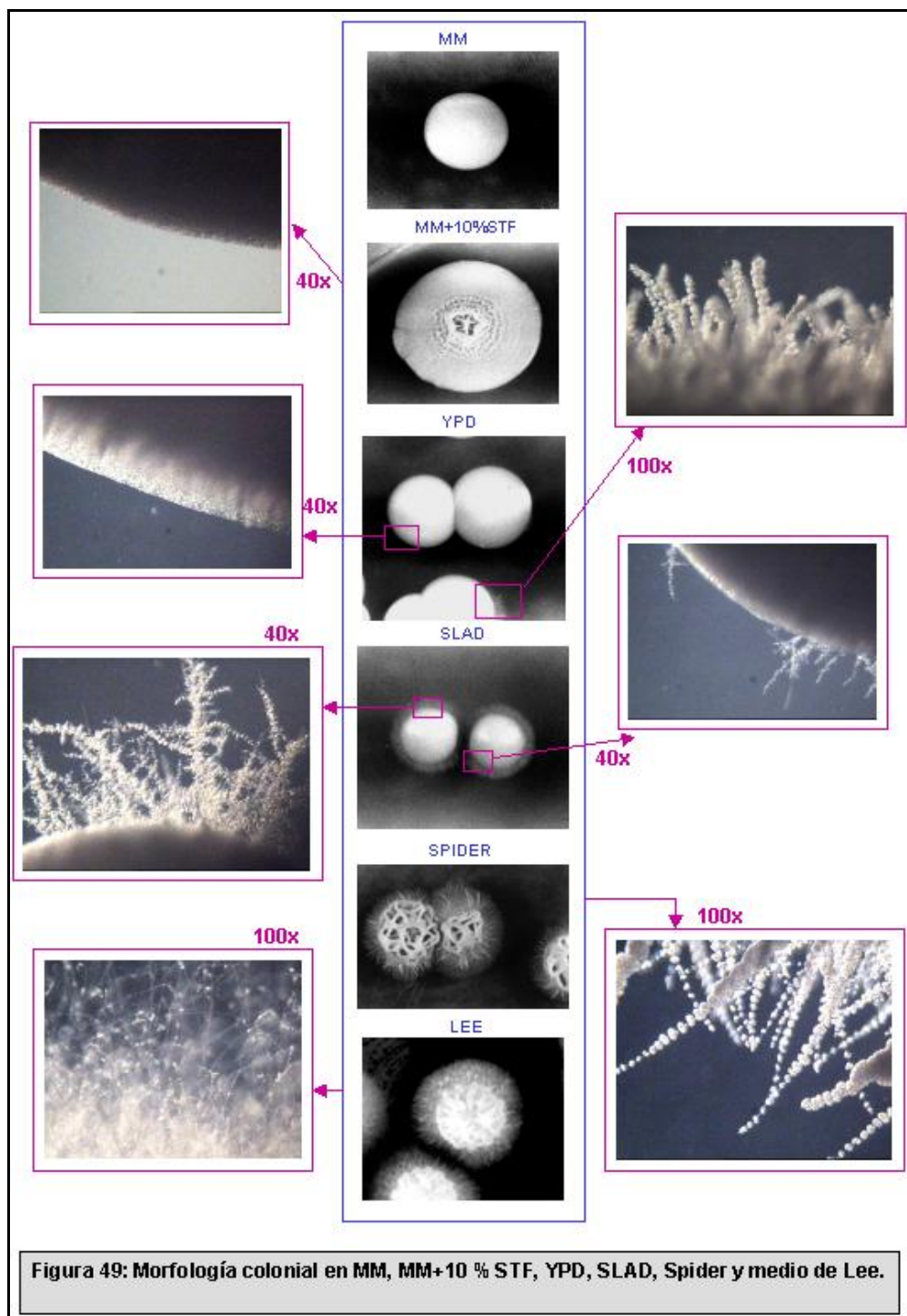
La segunda aproximación experimental utilizada para ver la capacidad de filamentación de las distintas cepas mutantes, fue la observación de la morfología colonial de las mismas en diversos medios, algunos inductores y otros no, de la filamentación.

En medios pobres (MM y SLAD) y en YPD, las colonias de todas las cepas, incluida CAF2, presentaban un aspecto liso. En los medios que han sido descritos como inductores de la filamentación en *C. albicans* (MM+10 % STF, Spider y medio de Lee), todos los mutantes, así como la cepa control, manifestaban un aspecto rugoso (Figura 49), característico de cada medio inductor.

Las fotografías de los bordes coloniales realizadas con amplificación de 40 y 100 aumentos en los diversos medios a los 7 días de incubación, permiten observar que en MM+10 % STF y en YPD los bordes son lisos. En el caso de YPD, además, cuando las placas se incubaban hasta 10 días, aparecían sectores de las colonias con bordes filamentosos. En Spider y medio de Lee, los bordes se muestran claramente filamentosos en todas las cepas. En medio SLAD, hay sectores de los bordes coloniales con más filamentos que otros, pero este fenómeno es aleatorio, no siguiendo ningún patrón de comportamiento (Figura 49)

La capacidad invasiva de *C. albicans* en las distintas cepas ensayadas se observó después de lavar las colonias crecidas en los diferentes medios con agua, como se ha indicado en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. La penetración en el agar es elevada en Spider, medio de Lee, SLAD y MM+10 % STF y muy poca en YPD (Figura 50).

Estos resultados indican que la delección de las diferentes glucanasas, *ENG1*, *ENG2* y *XOG1* no afecta significativamente ni la morfología colonial ni la invasividad en placa en los medios ensayados.



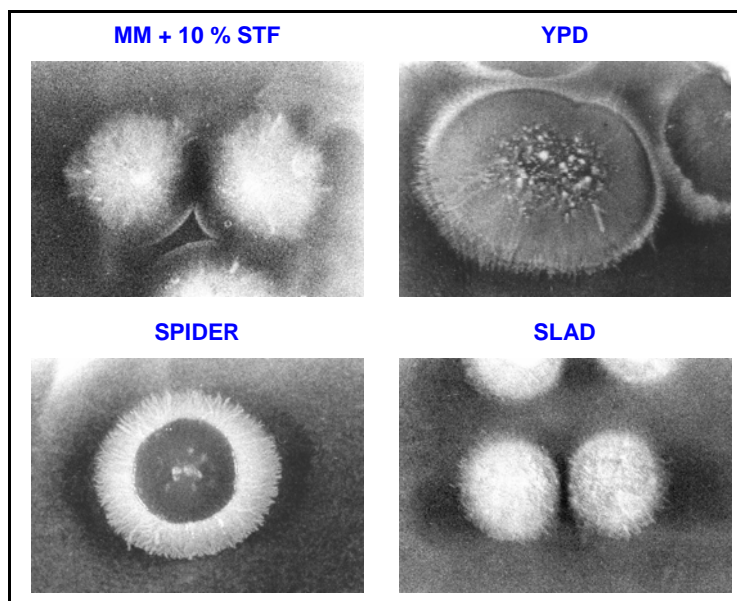


Figura 50:
Invasividad en
MM+10 % STF,
YPD, SLAD y
Spider.

13.3. Virulencia en un modelo murino.

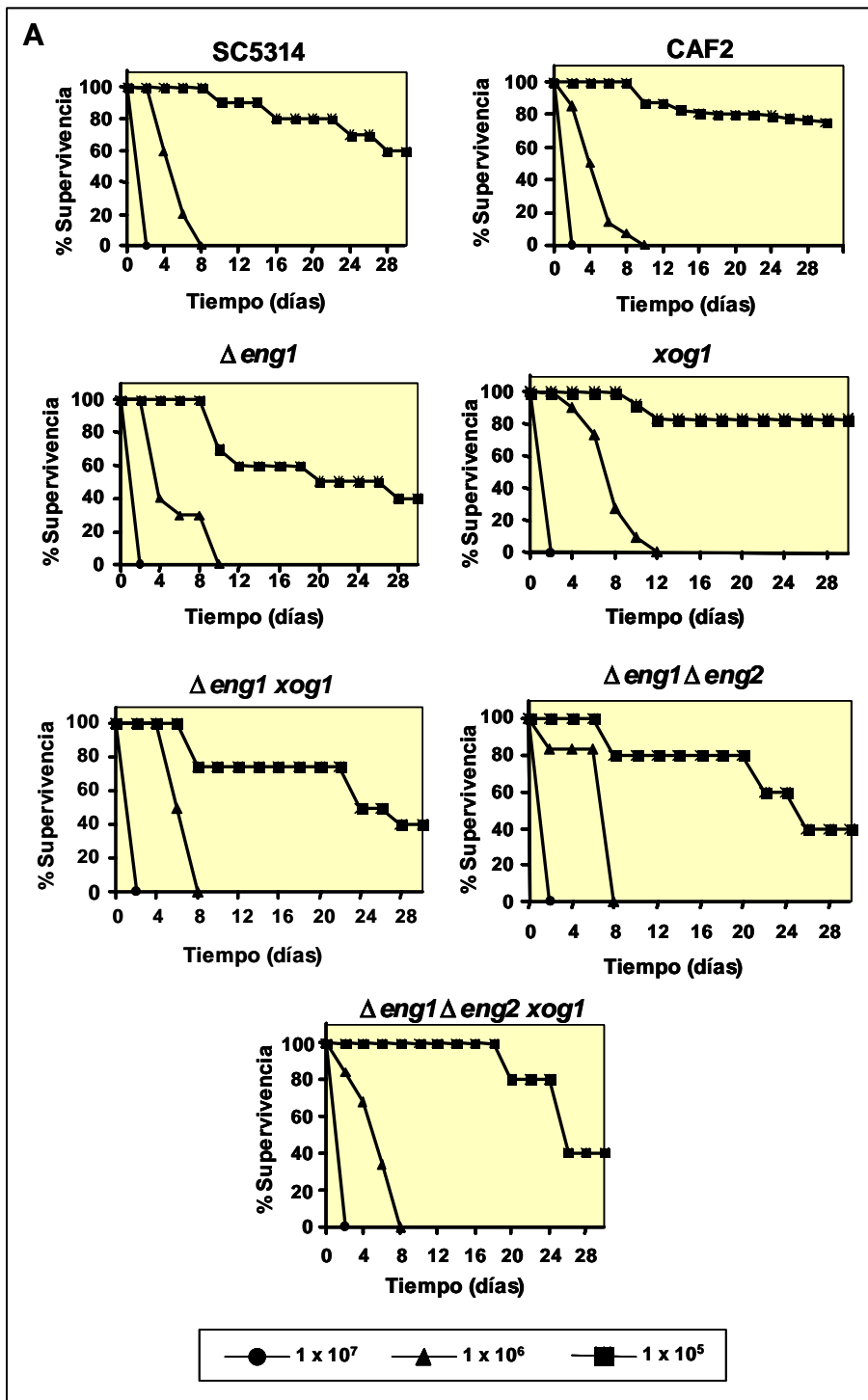
La resistencia del hospedador a la infección por *C. albicans* implica una serie de factores específicos y no específicos que han sido estudiados en un modelo murino de infección sistémica (Díez-Orejas *et al.* 1997; Alonso-Monge *et al.* 1999; Díez-Orejas *et al.* 1999; González Garcés *et al.* 1997). Este modelo reproduce con bastante exactitud las lesiones observadas en la enfermedad humana (Papadimitriou and Ashman 1986). Con el objetivo de determinar si existía alguna relación entre las diferentes glucanasas y la patogenicidad de *C. albicans*, se monitorizó el curso de la infección provocada por las diferentes cepas mutantes, como ya ha sido descrito en el apartado 11 de Materiales y Métodos.

En la figura 33 se puede observar que la inoculación de dosis elevadas (1×10^7 cél. y 1×10^6 cél.) de las distintas cepas de *C. albicans* analizadas produce la muerte de los ratones en pocos días. La inoculación de una dosis menor (1×10^5 cél.) produce una aparente infección crónica en los ratones BALB/c (figura 51A), mientras que en los ratones DBA/2, mueren todos los animales incluso a las dosis infectivas más bajas (Figura 51B)

El alojamiento de las diferentes cepas ensayadas en el riñón de los ratones es alto, como lo demuestra el valor del logaritmo de las unidades formadoras de colonias (log UFC) recogidas de las distintas estirpes de ratón (entre 4 y 6) (Figura 52). Cuando

la dosis infectiva es de 1×10^5 cél. se observa un aclaramiento renal del 75 % en la estirpe BALB/c. El alojamiento en el cerebro de los ratones es ligeramente inferior que en el riñón (log UFC entre 2 y 5). A la dosis infectiva más baja (1×10^5 cél.), el aclaramiento observado en el cerebro de la estirpe BALB/c corresponde al 100 %. Se confirma un menor alojamiento de la cepa *xog1* en el cerebro de los ratones más resistentes a la enfermedad, BALB/c, un resultado ya descrito (González Garcés *et al.* 1997). Como la patogenicidad de las cepas $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ ha sido igual que la de las cepas SC5314 y CAF2, no se ha analizado su alojamiento en riñón y cerebro.

Todos los resultados observados permiten señalar que no existen diferencias relevantes en la supervivencia de los ratones en ninguna de las cepas ensayadas, respecto de las cepas de referencia. El alojamiento de las levaduras en el riñón y el cerebro de los ratones para las cepas $\Delta eng1$ y $\Delta eng1 xog1$, es similar al de las cepas silvestre, SC5314 y de referencia, CAF2.



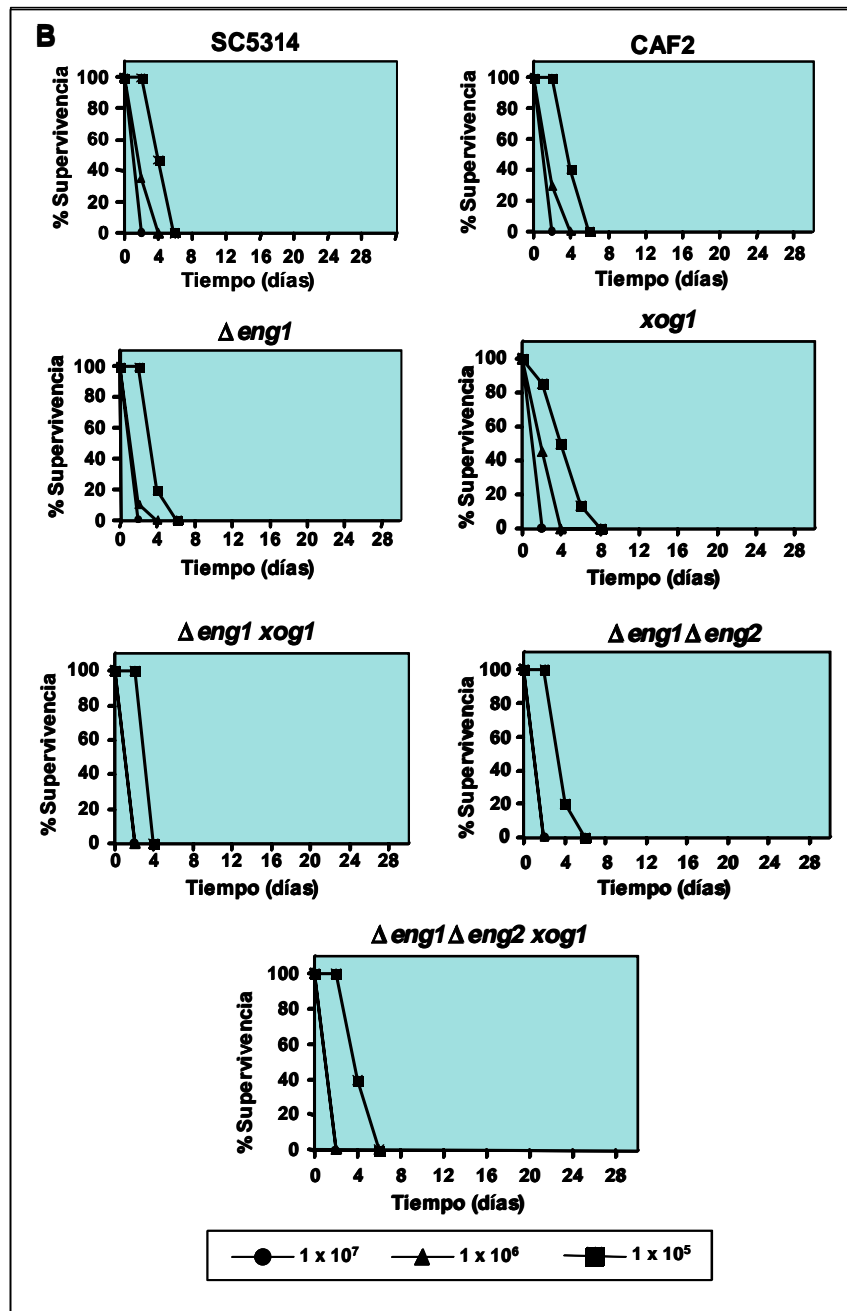


Figura 51: Porcentaje de supervivencia de los ratones a lo largo de la infección.

A) Estirpe de ratón empleada: BALB/c.

B) Estirpe de ratón empleada: DBA/2.

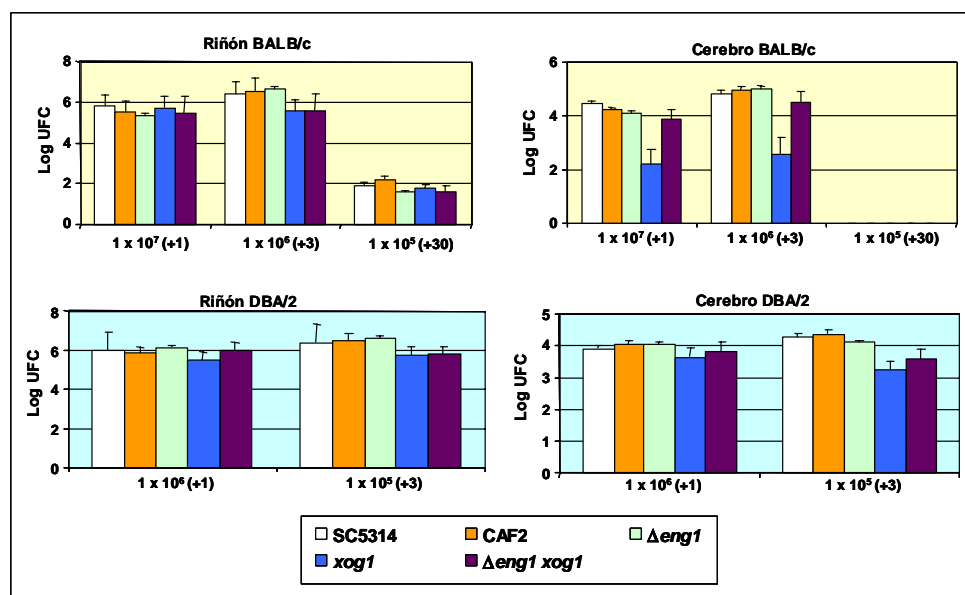


Figura 52: Capacidad de colonización de las cepas de levadura en el riñón y el cerebro del ratón.

13.4. Arquitectura de la pared celular.

Ya se ha comentado en la Introducción de esta memoria la importancia de la pared celular para la levadura. Considerando que las supuestas glucanasas *ENG1* y *ENG2* podrían estar implicadas en algún proceso relacionado con el mantenimiento de la integridad de esta estructura, se han realizado numerosas aproximaciones para dilucidar el papel funcional que podrían desempeñar.

A) Sensibilidad a la toxina killer K-500 de *Williopsis mrakii*.

Se ha ensayado la sensibilidad de las distintas cepas mutantes a la toxina *killer* K-500 de la levadura *W. mrakii*, con la finalidad de detectar posibles defectos en la pared celular que podrían acontecer en aquellas cepas en las que se ha llevado a cabo la delección conjunta de más de una glucanasa.

El experimento se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

Todas las cepas analizadas, incluida la cepa CAF2, presentan un halo de inhibición similar, con un diámetro entre 1,1 y 1,2 cm (Figura 53).



Figura 53: Sensibilidad a la toxina killer K-500 de *Williopsis mrakii*.

Cepas ensayadas: CAF2 (control), $\Delta eng1$, $xog1$, $\Delta eng1 xog1$, $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$.

B) Sensibilidad a zimoliasa.

La susceptibilidad de *S. cerevisiae* y *C. albicans* a la lisis por una mezcla de glucanasas-proteasas se ha usado de forma cuantitativa para comparar el estado de la pared celular (Navarro-García *et al.* 1995). La lisis se puede medir espectrofotométricamente en una solución hipotónica en presencia de zimoliasa. La densidad óptica de la suspensión celular disminuye a medida que las células se lisan (Ovalle *et al.* 1998). Se ha realizado un seguimiento de la muerte celular cada 15 min. durante 4 horas.

En la figura 54 puede observarse que la disminución de la D.O. en el tiempo, tras el tratamiento con $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de zimoliasa 20T, tiene lugar de forma semejante para todas las cepas ensayadas y que es similar al comportamiento de la cepa control CAF2. A los 15 o 20 min. del inicio del ensayo, se aprecia un 50 % de mortalidad. Una estabilización osmótica con sorbitol 1M protege en parte la lisis celular por acción de la zimoliasa (figura 55).

Se puede concluir que todas las cepas analizadas son tan sensibles a zimoliasa 20T como la cepa control CAF2 y que la estabilización osmótica mediante la adición de sorbitol 1M en el medio remedia la lisis parcialmente. Por tanto, la carencia de *ENG1*, *ENG2* y *XOG1* no parece contribuir significativamente a una mayor o menor sensibilidad a esta mezcla de enzimas líticas.

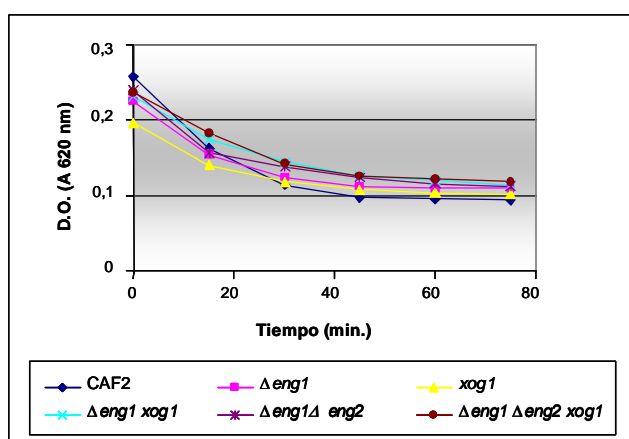


Figura 54: Sensibilidad a zimoliasa 20T ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Disminución de la D.O. (A 620 nm) en el tiempo para todas las cepas ensayadas.

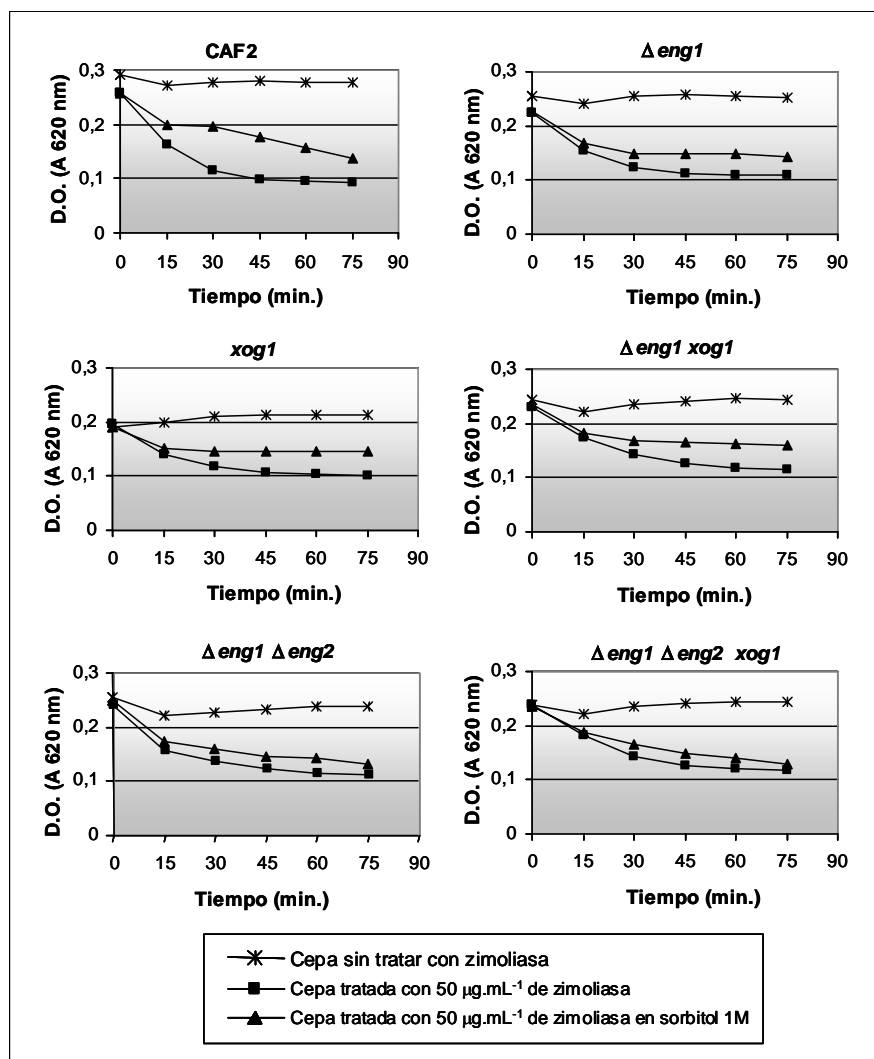


Figura 55: Sensibilidad a zimoliasa 20T.

Representación de la disminución de la D.O. en el tiempo para cada cepa, y remediación parcial con sorbitol.

C) Sensibilidad a antifúngicos y distintos agentes que interfieren con el metabolismo celular.

Con el objetivo de observar si las diferentes cepas carentes de una o más glucanasas manifestaban algún defecto funcional o estructural, se llevó a cabo un estudio de sensibilidad frente a diferentes compuestos antifúngicos, punto de partida de un estudio más profundo.

En la tabla 12 se enumeran los antifúngicos ensayados junto con las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) alcanzadas para cada cepa. Únicamente en el caso de la anfotericina B se observó una sutil diferencia: una mayor sensibilidad a este compuesto de las cepas $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ a las 48 h del ensayo (CMI=1,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) respecto a la cepa de referencia CAF2 (CMI=3,7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Un aspecto interesante fue el comportamiento frente a la Nikomicina Z, un inhibidor de la síntesis de quitina (Chapman *et al.* 1992). Se observó una ligera diferencia de sensibilidad, dependiente además, de la temperatura (tabla 13). Cuando el ensayo se realizó a 30 °C, todas las cepas manifestaron una elevada resistencia a este compuesto (CMI>125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), tanto a las 24 como a las 48 horas del ensayo; sin embargo, a 37 °C y a 42 °C, se observó que la cepa *xog1*, manifestaba una ligera sensibilidad a nikomicina Z (CMI=0,97 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 37 °C a las 24 h; CMI=1,95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 37 °C a las 48 h, y CMI=0,48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 42 °C a las 48 h) y que las cepas $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ presentaban una leve resistencia a este compuesto a las dos temperaturas mencionadas (CMI=3,9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 37 °C a las 24 h; CMI=15,6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 37 °C a las 48 h, y CMI=7,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 42 °C a las 48 h). El efecto de la temperatura sobre la efectividad de la nikomicina Z ha sido descrito previamente en mutantes de *S. cerevisiae* con la pared celular alterada (Popolo *et al.* 1997). A los cuatro días del ensayo, se realizó una última observación a 42 °C, comprobando que la cepa *xog1* seguía manteniendo una pequeña sensibilidad a nikomicina Z (CMI=0,97 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) y que las cepas $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ conservaban una ligera resistencia a dicho compuesto (CMI=31,25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), respecto de la cepa de referencia CAF2 (CMI=7,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Por tanto, el mutante *xog1* es entre cuatro y ocho veces más sensible a nikomicina Z que la cepa parental, resultado que contradice los datos publicados anteriormente (González Garcés *et al.* 1997), mientras que los mutantes $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$, presentan una resistencia entre dos y cuatro veces mayor que la cepa CAF2 a este compuesto y una sensibilidad dos veces mayor al anfotericina B.

ANTIFÚNGICO						
CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
24 h	CAF2	Δeng1	xog1	$\Delta\text{eng1 xog1}$	$\Delta\text{eng1 } \Delta\text{eng2}$	$\Delta\text{eng1 } \Delta\text{eng2 xog1}$
Anfotericina B	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Itraconazol	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Fluconazol	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
Ciclosporina	75	75	75	75	75	75
Tricodermol	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
5-fluorocitosina	>3	>3	>3	>3	>3	>3
Pneumocandina	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
48 h	CAF2	Δeng1	xog1	$\Delta\text{eng1 xog1}$	$\Delta\text{eng1 } \Delta\text{eng2}$	$\Delta\text{eng1 } \Delta\text{eng2 xog1}$
Anfotericina B	3,7	3,7	3,7	3,7	1,8	1,8
Itraconazol	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Fluconazol	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
Ciclosporina	75	75	75	75	75	75
Tricodermol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5-fluorocitosina	>3	>3	>3	>3	>3	>3
Pneumocandina	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3

Tabla 12 : Sensibilidad a distintos agentes mediante determinación de la CMI.

Placas multipocillo con concentraciones decrecientes de cada agente fueron inoculadas con 1×10^4 células.mL⁻¹ de cada cepa cuya sensibilidad se quería ensayar, e incubadas a 30 °C y 37 °C durante 48 h, realizándose dos lecturas visuales a las 24 y 48h. Los resultados expuestos corresponden a los datos más representativos de los diferentes ensayos realizados.

24 h		CAF2	$\Delta eng1$	<i>xog1</i>	$\Delta eng1$ <i>xog1</i>	$\Delta eng1$ $\Delta eng2$	$\Delta eng1 \Delta eng2$ <i>xog1</i>
	30 °C	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	37 °C	1,95	1,95	0,97	1,95	3,9	3,9
48 h							
	30 °C	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	37 °C	7,8	7,8	1,95	7,8	15,6	15,6
	42 °C	3,9	3,9	0,48	3,9	7,8	7,8
4 días							
	42 °C	7,8	7,8	0,97	7,8	31,25	31,25

Tabla 13: Resistencia/sensibilidad a nikomicina Z.

La tabla muestra las CMI_s ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) frente a nikomicina Z de las cepas indicadas, a las distintas temperaturas, usando la técnica de dilución en placa. El ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados expuestos corresponden a los datos más representativos.

D) Sensibilidad a compuestos que interfieren con la integridad de la pared celular.

Se han llevado a cabo ensayos de sensibilidad en placa frente a compuestos como el **rojo Congo** (compuesto que afecta al ensamblaje de las cadenas de β -1,3-glucano (Kopecka and Gabriel 1992)); el **blanco de calcoflúor** (fluorocromo que se une a las cadenas en formación de quitina, y β -1,3-glucano en menor medida, impidiendo la cristalización y el ensamblaje de las microfibrillas (Roncero and Duran 1985)); **crystal violeta** (no se conoce muy bien su mecanismo de acción, pero algunos mutantes que tienen la pared celular alterada, manifiestan sensibilidad a este compuesto); **SDS** (interacciona con los componentes de la membrana plasmática (Saija *et al.* 1997)); **ortovanadato sódico** e **higromicina B**. La sensibilidad/resistencia de los mutantes ensayados a estos compuestos podría ser un signo de una pared celular dañada. Se ha optimizado este ensayo respecto a la concentración de los diferentes compuestos utilizados.

En las tablas 2 y 3 de Materiales y Métodos se ha indicado la nomenclatura abreviada empleada para citar a las diferentes cepas. Sin embargo, en este epígrafe

Resultados

usaremos los términos *XOG1/xog1* y *xog1/xog1* para referirnos a las cepas heterocigótica y homocigótica interrumpidas en el gen *XOG1*, y los términos *ENG1/eng1* y *eng1/eng1* para referirnos a las cepas heterocigótica y homocigótica delecionadas en el gen *ENG1*.

En ninguna de las cepas ensayadas se ha podido apreciar sensibilidad o resistencia a cafeína, cristal violeta y ortovanadato sódico, a las diferentes concentraciones usadas. Sin embargo, sí se evidenció una acusada sensibilidad del mutante carente del gen *XOG1* tanto en su forma heterocigótica como en la homocigótica, a rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS. La deleción del primer y segundo alelo del gen *ENG1*, no producía ningún fenotipo visible respecto de estos compuestos, comportándose como la cepa CAF2. Se detectó con sorpresa que la interrupción de *XOG1* en un mutante previamente delecionado en el gen *ENG1* suprimía la sensibilidad que manifestaba el mutante *xog1* (Figura 56) (Tabla 14).

Tabla 14: Sensibilidad a rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS de los mutantes afectados en los genes *XOG1* y *ENG1*.

	Rojo Congo 125 µg.mL ⁻¹	Rojo Congo 250 µg.mL ⁻¹	Blanco de calcoflúor 25 µg.mL ⁻¹	Higromicina B 250 µg.mL ⁻¹	SDS 0,05 %
CAF2	+	++	-	+	+
<i>XOG1/xog1</i>	+++	++++	++	+++	+++
<i>xog1/xog1</i>	+++	++++	++	+++	+++
<i>ENG1/eng1</i>	+	++	-	+	+
<i>eng1/eng1</i>	+	++	-	+	+
<i>XOG1/xog1</i> <i>Δeng1</i>	+	++	-	+	+
<i>xog1/xog1</i> <i>Δeng1</i>	+	++	-	+	+

++++ hipersensible; +++ muy sensible; ++ sensible; + ligeramente sensible; - no sensible

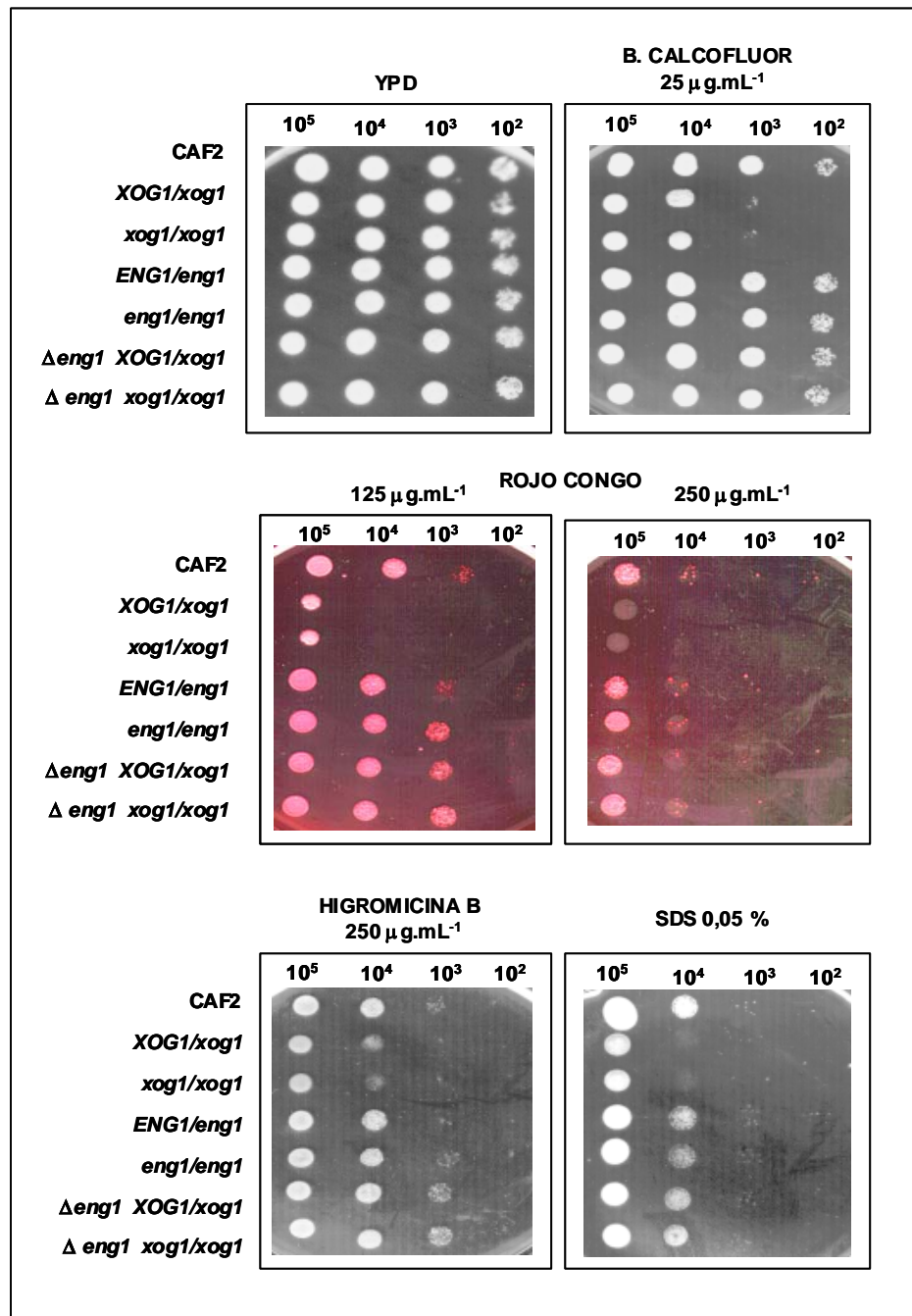


Figura 56: Sensibilidad a rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS.

Resultados

Para verificar que los fenotipos que se observaban eran debidos únicamente a la delección e interrupción de *ENG1* y *XOG1* respectivamente, y no a otros fenómenos, se analizaron, en primer lugar, varios transformantes de cada cepa y en segundo lugar, se procedió a reintegrar el gen *ENG1* en su *locus*, en el mutante $\Delta eng1 xog1$ (ver apartado 9 de Resultados).

Tras la obtención de este reintegrante, se analizó su sensibilidad a los compuestos anteriormente citados. En primer lugar se comprobó que todos los transformantes de una misma cepa tenían un comportamiento similar, es decir, todos los mutantes que llevaban el gen *XOG1* interrumpido eran muy sensibles a los compuestos analizados, y todos los mutantes $\Delta eng1 xog1$ no manifestaban ningún tipo de sensibilidad a los mismos. Al integrar el gen *ENG1* en la cepa doble delecionada en los genes *ENG1* y *XOG1*, se advirtió una recuperación de la sensibilidad a higromicina B y SDS, característica de un mutante sencillo *xog1*. Sin embargo, no se recuperaba la sensibilidad ni a rojo Congo, ni a blanco de calcoflúor (Figura 57) (Tabla 15).

Tabla 15: . Sensibilidad a compuestos que afectan a la integridad de la pared celular en la cepa reintegrante *ENG1* $\Delta eng1 xog1$.

	Rojo Congo 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Blanco de calcoflúor 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Higromicina B 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	SDS 0,05 %
<i>xog1</i> (a)	+++	++	+++	+++
<i>xog1</i> (b)	+++	++	+++	+++
$\Delta eng1 xog1$ (7)	+	-	+	+
$\Delta eng1 xog1$ (19)	+	-	+	+
$\Delta eng1 xog1$ (20)	+	-	+	+
<i>ENG1</i> $\Delta eng1 xog1$ (9)	+	-	++	++
<i>ENG1</i> $\Delta eng1 xog1$ (14)	+	-	++	++
<i>ENG1</i> $\Delta eng1 xog1$ (24)	+	-	+++	+++

++++ hipersensible; +++ muy sensible; ++ sensible; + ligeramente sensible; - no sensible

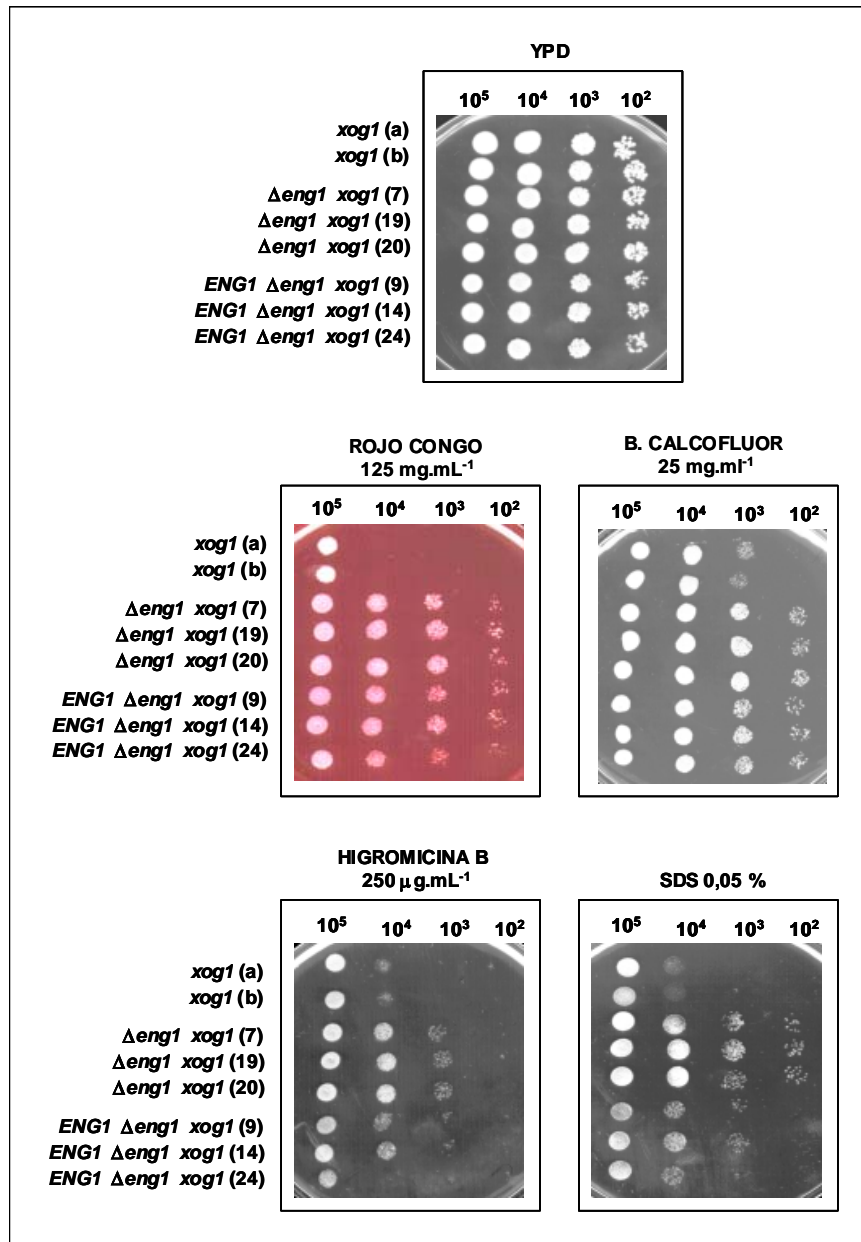


Figura 57: Sensibilidad a compuestos que afectan a la integridad de la pared celular en la cepa reintegrante $ENG1 \Delta eng1 xog1$.

Los números y letras incluidos entre paréntesis corresponden a transformantes diferentes de una misma cepa.

Resultados

Se pensó que el no ver recuperación de la sensibilidad a rojo Congo y blanco de calcoflúor podría ser debido a que sólo se integraba una copia del gen *ENG1*, y la cepa *xog1* lleva las dos. Por este motivo se decidió integrar *ENG1* bajo la regulación de un promotor fuerte, *ACT1^{PR}*, que permitiese una mayor expresión de dicho gen (ver apartado 10 de Resultados)

En la figura 58 y la tabla 16 se presenta la sensibilidad/resistencia de varios transformantes de la cepa que sobreexpresaría *ENG1*, y de la cepa $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$.

Hay que destacar que la cepa que sobreexpresaría *ENG1* crece mucho más lentamente que todas las demás cepas analizadas (tg=102 min. en medio YPD y tg=180 min. en MM, frente a 85 min. en YPD y 110 min. en MM para el resto de las cepas). Además, no se observa una recuperación de la sensibilidad a rojo Congo y blanco de calcoflúor, y sí una clara hipersensibilidad a SDS; es decir, no sólo recupera la sensibilidad a este compuesto como ya lo hacía el reintegrante en su *locus*, sino que exhibe una sensibilidad más acusada que la cepa *xog1*. También se observa una recuperación de la sensibilidad a higromicina B.

Ningún transformante analizado de la cepa carente de los genes *ENG1*, *ENG2* y *XOG1* muestra sensibilidad alguna a rojo Congo y SDS (Figura 58) (Tabla 16).

Tabla 16. Sensibilidad a rojo Congo y SDS de las cepas *ACT1^{PR}-ENG1 $\Delta eng1$ *xog1 y de la cepa $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$.**

	Rojo Congo 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	SDS 0,05 %
<i>xog1</i>	+++	+++
$\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ (3)	-	-
$\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ (5)	-	-
$\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ (24)	-	-
<i>ACT1^{PR}-ENG1 $\Delta eng1 xog1$</i> (1)	-	++++
<i>ACT1^{PR}-ENG1 $\Delta eng1 xog1$</i> (2)	-	++++
<i>ACT1^{PR}-ENG1 $\Delta eng1 xog1$</i> (3)	-	++++
<i>ACT1^{PR}-ENG1 $\Delta eng1 xog1$</i> (4)	-	++++

++++ hipersensible; +++ muy sensible; ++ sensible; + ligeramente sensible;

- no sensible

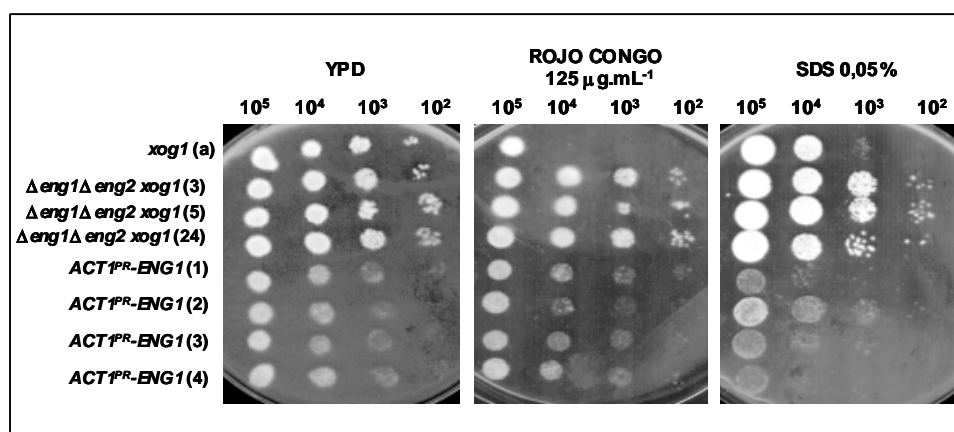


Figura 58: Sensibilidad a rojo Congo y SDS de las cepas $ACT1^{PR}-ENG1 \Delta eng1 xog1$ y de la cepa $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$.

Los números y letras incluidos entre paréntesis corresponden a transformantes diferentes de una misma cepa.

La figura 59 y la tabla 17 engloban la sensibilidad/resistencia de todas las cepas ensayadas frente a rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS. Se incluye también la cepa CNC89 ($ENG1 \Delta eng1 \Delta eng2$) como aproximación al comportamiento que podría tener el mutante sencillo deletado en $ENG2$ (ver apartado 11 de Resultados). Lo más significativo que se recoge, y que ya ha sido comentado, es la elevada sensibilidad del mutante $xog1$ a estos compuestos que afectan a la integridad celular, sensibilidad que no se observa ni en un mutante $\Delta eng1$, ni en un mutante $\Delta eng1 xog1$, y que se recupera, respecto a higromicina B y SDS, al integrar $ENG1$ en la cepa $\Delta eng1 xog1$, tanto en su *locus*, como bajo la regulación de un promotor fuerte. Además, la sobreexpresión de $ENG1$ en la cepa $\Delta eng1 xog1$ origina hipersensibilidad a SDS. En la delección conjunta de $ENG1$ y $ENG2$ se advierte sensibilidad de la cepa a higromicina B, fenómeno observado también en la cepa $ENG1 \Delta eng1 \Delta eng2$, lo que podría sugerir que un mutante $\Delta eng2$ se comportase del mismo modo. Ya se ha indicado que el triple mutante $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$ no exhibía sensibilidad ni a rojo Congo, ni a blanco de calcoflúor ni a SDS; sin embargo, presenta una sensibilidad a higromicina B similar a la de la cepa $\Delta eng1 \Delta eng2$.

Tabla 17: Sensibilidad de todos los mutantes obtenidos a los compuestos rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS.

	Rojo Congo 125 µg.mL ⁻¹	Blanco de Calcoflúor 25 µg.mL ⁻¹	Higromicina B 250 µg.mL ⁻¹	SDS 0,05 %
CAF2	+	-	+	+
<i>Δeng1</i>	+	-	+	+
<i>xog1</i>	+++	++	+++	+++
<i>Δeng1 xog1</i>	+	-	+	+
<i>ENG1 Δeng1 xog1</i>	+	-	++	++
<i>ACT1^{PR}-ENG1 Δeng1/xog1</i>	+	-	++	++++
<i>ENG1 Δeng1 Δeng2</i>	+	-	++	+
<i>Δeng1 Δeng2</i>	+	-	++	+
<i>Δeng1 Δeng2 xog1</i>	+	-	++	+

++++ hipersensible; +++ muy sensible; ++ sensible; + ligeramente sensible; - no sensible

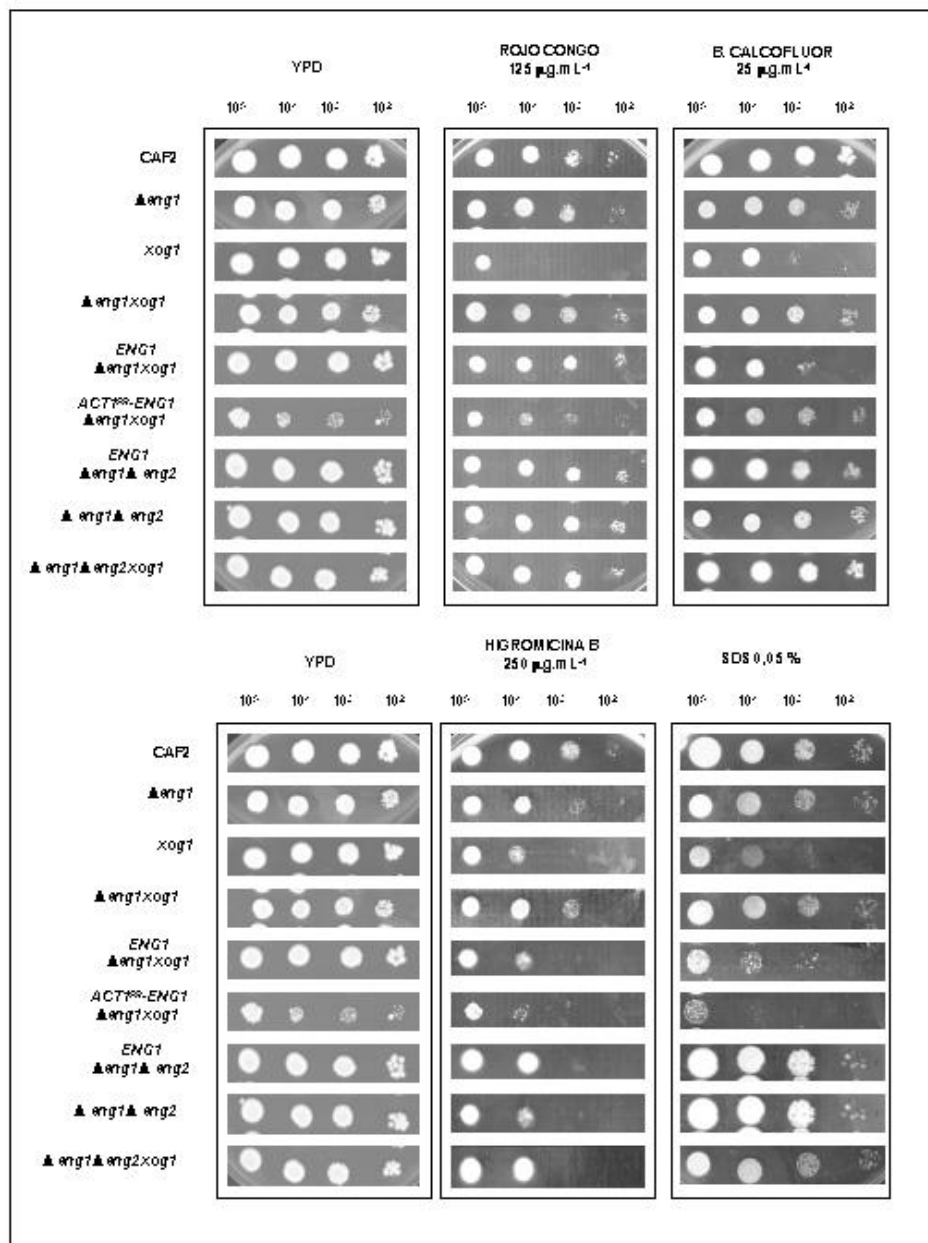


Figura 59: Sensibilidad de todos los mutantes obtenidos a los compuestos rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Debido a la relevancia clínica que ha alcanzado *C. albicans* en las últimas décadas y al fenómeno del dimorfismo como programa de diferenciación morfogénica potencialmente implicado en virulencia, esta levadura ha sido objeto de estudio por parte de muchos grupos de investigación de todo el mundo. Su manipulación genética, a pesar de la dificultad que conlleva la diploidía y la carencia de ciclo sexual, es más fácil que en otros hongos patógenos como *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* o diferentes especies de *Aspergillus*. Por todas estas razones, *C. albicans* se ha convertido en el principal modelo de hongo patógeno en que estudiar el dimorfismo, analizar la virulencia e identificar nuevas dianas antifúngicas. En los últimos años se han desarrollado algunas herramientas genéticas como los sistemas de transformación, diversas estrategias de interrupción génica, plásmidos autoreplicativos, promotores regulados y sistemas de genes indicadores. Con ello se han sentado las bases para el estudio molecular de este microorganismo (ver de Backer *et al.* 2000; Pla *et al.* 1996 para revisiones recientes). Además, la secuenciación del genoma de *C. albicans* abre una nueva era en el estudio de este microorganismo, y con ello, potencialmente, en el descubrimiento de nuevos antifúngicos.

Sin embargo, a pesar de los avances en el análisis de este hongo, existen todavía aspectos relacionados con la terapia no resueltos, como el desarrollo de vacunas o antimicrobianos eficaces en todas las situaciones terapéuticas. La comprensión básica de su fisiología es, pues, imprescindible para definir nuevas dianas, aproximaciones al tratamiento de sus infecciones o vacunas encaminadas a generar una respuesta inmunitaria eficaz. Parte de la investigación en nuestro departamento se ha centrado en el estudio de la pared celular, tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*. La pared celular es una estructura diferencial entre hongos y células animales superiores y esto la convierte en una diana potencial para el diseño de antifúngicos con toxicidad selectiva.

Este trabajo se ha centrado, así, en el estudio de dos presuntas endo- β -1,3-glucanasas implicadas en la construcción de la pared celular en *C. albicans*. Las glucanasas son las hidrolasas mayoritarias de la pared celular de levaduras y hongos. En nuestro laboratorio se había caracterizado el gen *XOG1* que codifica la exo- β -1,3-glucanasa mayoritaria de *C. albicans* (González Garcés *et al.* 1997) y tan sólo recientemente se han clonado otros dos genes con elevada similitud a las enzimas de actividad exohidrolítica, *CaEXG2* y *CaEXG3*. (Vázquez de Aldana *et al.* 2001). En *S. cerevisiae* se conocían varias enzimas capaces de degradar las cadenas de β -1,3-glucano, como los productos de los genes *EXG1*, *EXG2* y *SSG1* con actividad exohidrolítica (ver Cid *et al.* 1995), y los genes *BGL2* (Mrsa *et al.* 1993), *ENG1* y *ENG2* (Baladrón García 1997) con actividad endohidrolítica. Existen grandes diferencias, tanto en el patrón de expresión de estos genes en las distintas etapas del ciclo de vida de *S. cerevisiae*, como en la localización de sus productos. Por estos motivos, la posibilidad de caracterizar los genes *CaENG1* y *CaENG2* de *C. albicans* generaba unas

expectativas grandes en cuanto a la comprensión de la participación de dichas enzimas en los procesos morfogénicos de la levadura, relacionados con la dinámica de la pared celular y por tanto, la posible identificación de las mismas como potenciales dianas antifúngicas.

1. Clonación y delección de los genes *CaENG1* y *CaENG2*.

El planteamiento de la clonación de nuevos genes que codificaran β -glucanasas en *C. albicans* implicaba ciertas dificultades.

La posibilidad de conseguir nuevos mutantes por métodos convencionales -partiendo de estirpes *xog1*- e intentar su complementación fenotípica mediante transformación con genotecas de DNA era una alternativa laboriosa, puesto que las cepas *xog1* siguen presentando una actividad glucanasa residual detectable que podría dificultar dicha aproximación (González Garcés *et al.* 1997). La utilización de la purificación bioquímica y posterior secuenciación del extremo aminoterminal era, creíamos, técnicamente más compleja y larga. Por ello, se optó por una aproximación bioinformática basándonos en la supuesta similitud de dichas proteínas. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las glucanasas codificadas por los genes *ScENG1*, *ScENG2* y *eng2+* ponía de manifiesto la existencia de varios bloques de elevada similitud entre las tres proteínas y con ello, la posibilidad de la utilización de la PCR en la búsqueda de nuevas enzimas hidrolíticas de glucano en *C. albicans*. De hecho, esta aproximación había sido utilizada con éxito en la clonación del gen *ScENG1* (Baladrón García 1997) y, más recientemente, en la de seis genes que codifican exo- β -1,3-glucanasas en levaduras no convencionales con interés bien de tipo biotecnológico (Esteban *et al.* 1999) o clínico (Vázquez de Aldana *et al.* 2001). Finalmente esta estrategia permitió la clonación del gen *CaENG1* (Dr. Pedro Felipe Esteban. Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca). La disponibilidad del genoma de este microorganismo durante el transcurso de esta tesis (www-sequence.stanford.edu/group/Candida/) permitió la identificación de un fragmento de DNA que por su elevada homología con el gen *ScENG2* fue denominado *CaENG2* (Dr. Francisco del Rey. Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca).

Con el fin de elucidar la función biológica de los genes *CaENG1* y *CaENG2* de *C. albicans*, se procedió a su delección, empleándose para ello el sistema habitual descrito por Fonzi e Irwin utilizando la casete *hisG-URA3-hisG* (Fonzi and Irwin 1993), el más utilizado hasta el momento (de Backer *et al.* 2000). Mientras que *CaENG1* fue delecionado con relativa facilidad, ello no pudo obtenerse para *CaENG2* en el fondo genético silvestre de la cepa CAI4 (tras el análisis de más de 60 clones analizados) pero sí en el fondo mutante *Caeng1* Δ . Este resultado sugería que nos encontrábamos, *a priori*, con un gen esencial en una cepa silvestre, aunque no lo fuera en un fondo *Caeng1* Δ .

Este hecho era relevante y potencialmente muy interesante por cuanto sugería la existencia de un cierto grado de interrelación funcional entre ambas actividades

enzimáticas. Sin embargo, las conclusiones a extraer son dependientes del grado de recombinación homóloga entre el DNA donador y receptor y ello tiene lugar de forma muy variable en *C. albicans*. Así, la frecuencia con la que el proceso de delección se lleva a cabo correctamente por recombinación homóloga, frente a aquellos casos en los cuales la construcción se integra en otra región del genoma, es muy variable. Esto ocurre tanto en el primer alelo, con unos porcentajes que oscilan entre el 100 % y el 15 %, como en el segundo alelo, (porcentajes entre el 60 % y el 7 %). Así, por ejemplo, estos datos fueron 40 % para el primer alelo y 20 % para el segundo alelo en el gen *MKC1* (Navarro-García *et al.* 1995), 80 % para el primer alelo y 33 % para el segundo en el gen *ADE2* (Fonzi and Irwin 1993), para *BGL2* los porcentajes son del 33 % en el primer alelo y 7 % en el segundo (Sarthý *et al.* 1997), 15 % en el caso del primer alelo y 15 % en el segundo para el gen *ARG5,6* (Negredo *et al.* 1997) y en la exoglucanasa *XOG1* los porcentajes de recombinación homóloga corresponden a un 60 % para ambos alelos (González Garcés 1998). En nuestro caso, respecto a la integración de la construcción de delección de *CaENG1* en el locus adecuado, se obtuvieron 6 clones buenos de 6 analizados en el primer alelo del gen, y 2 clones buenos de un total de 6 analizados en el segundo alelo. En el proceso de delección del gen *CaENG2*, la recombinación homóloga adecuada en el primer alelo del gen se dio en 2 clones de 6 analizados sobre la cepa CAI4 y en 3 clones de 6 analizados cuando la disrupción se realizó en el fondo genético $\Delta Caeng1$. En el caso de la delección del segundo alelo del gen en dicho fondo genético, se obtuvo 1 clon con los dos alelos del gen *CaENG2* deleccionados correctamente, de 6 clones analizados.

Esta variabilidad dificulta la extracción de conclusiones que permitan determinar el carácter esencial de un gen en este microorganismo y depende de características específicas de cada gen concreto, su localización cromosómica, su nivel de expresión o la longitud del DNA homólogo de las regiones flanqueantes de la casete de disrupción. También puede ser el resultado del polimorfismo existente en algunas cepas, por el cual un gen clonado puede diferir en parte de la secuencia del gen de la cepa hospedadora en alguno de sus alelos, o puede depender incluso del propio sistema o técnica de transformación (de Backer *et al.* 2000).

Para evaluar la posible esencialidad de *CaENG2* en un fondo silvestre, reintegramos el gen *CaENG1* en una cepa $\Delta eng1 \Delta eng2$. La obtención de transformantes *CaENG1* $\Delta eng1 \Delta eng2$ en éste prácticamente descarta el hecho de que el gen *CaENG2* sea esencial, aunque hay que tener en cuenta que el reintegrante es heterocigótico para el gen *CaENG1* a diferencia de lo que ocurre en la cepa CAI4. Nuestros datos, por el contrario, sugieren explicaciones alternativas de tipo técnico al problema de la delección genética. Por ejemplo, en la estrategia clásica se usa la misma construcción genética que se emplea en la delección del primer alelo, por lo cual puede recombinar con el alelo ya interrumpido durante la segunda ronda de transformación. De hecho, esta recombinación puede ocurrir con una frecuencia más elevada que la que se dio en el primer alelo, probablemente debido a la presencia del fragmento *hisG* (de Backer *et al.* 2000) y con ello de mayor cantidad de DNA homólogo. Éste podría ser el motivo por el que no se ha logrado la delección del segundo alelo silvestre del gen

CaENG2, aunque no es fácil entonces explicar el por qué sí se consiguió en el mutante $\Delta eng1 \Delta eng2$. En cualquier caso, ello sugiere la utilización de esquemas de interrupción alternativos en los cuales la construcción *hisG-URA3-hisG* tuviera una orientación opuesta a la usada en la primera transformación o construcciones en las cuales el gen *URA3* fuera flanqueado con regiones diferentes. En nuestro laboratorio se han utilizado recientemente construcciones en las que se usan los genes bacterianos de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y aminoglucósidos (*aph*) flanqueando este marcador.

Otras explicaciones alternativas sería la existencia de polimorfismo, como sucede para *PHR1*. En la delección de dicho gen se utilizó el sistema tradicional para la primera copia, mientras que se optó por una estrategia de integración y expulsión ("pop-in/pop-out") en el caso de la segunda copia (Saporito-Irwin *et al.* 1995), debido a la dificultad de obtener cepas homocigóticas cuando se utilizaba la misma construcción para ambos alelos. La explicación sugerida a este fenómeno se basa en diferencias alélicas existentes en el locus *PHR1*, que fueron detectadas por el polimorfismo presentado para algunas enzimas de restricción. Según esto, diferencias en los extremos del DNA transformante con respecto a una de las copias genómicas del locus podrían dificultar la recombinación en esa copia frente a su integración en otro alelo (el cual es igual al DNA transformante), aunque éste ya se haya interrumpido previamente (de Backer *et al.* 2000). Aun cuando podría tratarse de un fenómeno de polimorfismo, hay que tener en cuenta que ha sido posible la delección del segundo alelo del gen en otro fondo genético, por lo cual no parece ser éste el problema.

Finalmente, la interrupción del gen *XOG1*, tanto en un fondo genético $\Delta eng1$ como en un fondo genético $\Delta eng1 \Delta eng2$, parecía interesante por la posibilidad que nos brindaba de abordar desde otra perspectiva el papel de *CaENG1* y *CaENG2* en *C. albicans*. El mutante nulo *xog1* fue obtenido en nuestro laboratorio (González Garcés *et al.* 1997) y la comprobación de la interrupción correcta de los dos alelos del gen *XOG1* podía realizarse fenotípicamente, gracias a la capacidad de Xog1p de hidrolizar el sustrato fluorogénico MUG liberando metilumbeliferona, compuesto que se detecta por la fluorescencia que emite tras su excitación con luz ultravioleta. En el proceso de interrupción, el porcentaje de transformantes en los que se había producido recombinación homóloga fue de un 50 % en el primer alelo y de un 20 % en el segundo, inferiores a los descritos (González Garcés 1998).

Todas las caracterizaciones fenotípicas se realizaron empleando como control la cepa de referencia CAF2; y en algunos casos la cepa silvestre SC5314. Las estirpes mutantes empleadas en los ensayos son heterocigóticas para el gen *URA3*: *xog1*, $\Delta eng1$, $\Delta eng1 xog1$, $\Delta eng1 \Delta eng2$ y $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$; y en algunos casos, se utilizaron también cepas que llevan el gen *CaENG1* reintegrado, bien en su región cromosómica (como en el caso de las estirpes *ENG1 $\Delta eng1 xog1$* y *ENG1 $\Delta eng1 \Delta eng2$*), bien en el gen *LEU2* bajo la expresión del promotor del gen de la actina *ACT1* (Delbruck and Ernst 1993), un promotor fuerte y constitutivo que permitiría la sobreexpresión de *CaENG1* (*ACT1^{PR} ENG1 $\Delta eng1 xog1$*). La reintroducción del gen de interés en la cepa mutante que carece del mismo es fundamental para comprobar que

los fenotipos observados en la cepa delecionada son debidos a la ausencia del gen en cuestión y no a otros fenómenos.

2. Relación de los genes *CaENG1* y *CaENG2* con la pared celular.

Una conclusión interesante del trabajo descrito es el posible papel que pueden desempeñar estas proteínas en la construcción de la pared celular, deducido de las diferencias sutiles en unos casos y notables en otros, pero claras, respecto a la sensibilidad a diferentes compuestos que por mecanismos diversos interfieren con algún componente de la pared celular.

Los experimentos de sensibilidad a zimoliasa y a la toxina *killer* K-500 de *W. mrakii*, diseñados con intención de detectar una posible alteración en el β -glucano, no han permitido observar ninguna diferencia relevante entre la sensibilidad manifestada por las estirpes ensayadas y la cepa utilizada como control CAF2. Tampoco se apreciaron diferencias importantes en la sensibilidad a antifúngicos y distintos agentes que interfieren en el metabolismo celular, entre ellos la pneumocandina (Ghannoum and Rice 1999), un inhibidor de la síntesis del β -glucano.

Se ha considerado oportuno reflejar en una tabla un resumen de los fenotipos observados para facilitar la lectura de esta discusión.

Tabla 18: Fenotipos observados en la caracterización de los diversos mutantes.

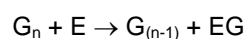
	Nikomicina Z	Rojo Congo	Blanco de Calcoflúor	Higromicina B	SDS	Anfotericina B
CAF2	+	+	-	+	+	+
$\Delta eng1$	+	+	-	+	+	+
<i>xog1</i>	+++	+++	++	+++	+++	+
$\Delta eng1 xog1$	+	+	-	+	+	+
<i>ENG1</i> $\Delta eng1 xog1$	NE	+	-	++	++	+
<i>ACT1^{PR}-ENG1</i> $\Delta eng1 xog1$	NE	+	-	++	++++	+
<i>ENG1</i> $\Delta eng1 \Delta eng2$	NE	+	-	++	+	+
$\Delta eng1 \Delta eng2$	-	+	-	++	+	++
$\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$	-	+	-	++	+	++

++++ hipersensible; +++ muy sensible; ++ sensible; + ligeramente sensible; - no sensible o resistente; NE no ensayado

Respecto a la sensibilidad a un inhibidor de la síntesis de quitina, la nikomicina Z, se ha observado que la estirpe *xog1* es entre 4 y 8 veces más sensible a este compuesto que la cepa de referencia en contradicción con lo publicado hasta el momento (González Garcés *et al.* 1997). En ninguna de las cepas ensayadas hasta el momento se ha podido apreciar sensibilidad o resistencia a cristal violeta y ortovanadato sódico a las diferentes concentraciones empleadas, sustancias que suelen dar lugar a fenotipos claros en aquellos mutantes en los cuales existen alteraciones de la pared celular. Sin embargo, los mutantes *xog1*, tanto heterocigotos como homocigotos presentan una elevada sensibilidad a compuestos como el rojo Congo, el blanco de calcoflúor, la higromicina B o el SDS.

La delección de *CaENG1* no producía ningún fenotipo diferencial frente a estos compuestos. Por tanto, esperábamos encontrar que los mutantes $\Delta eng1$ *xog1* se comportaran de una forma similar a los mutantes *xog1*; sin embargo, resultó sorprendente constatar que la delección del gen *XOG1* en una cepa defectiva en el gen *CaENG1* originaba un mutante en el que no se observaba ninguna sensibilidad ni a los compuestos anteriormente citados ni a nikomicina Z. Esta situación es conceptualmente similar a la que sucede cuando se delecionan simultáneamente las posibles glucanasas de *S. cerevisiae* Scw4p y Scw10p junto a la proteína Bgl2p. Así, en diversos fenómenos (crecimiento, liberación de proteínas y apareamiento), Scw4p y Scw10p muestran un efecto sinérgico que se ve antagonizado por Bgl2p. Este fenómeno puede interpretarse como un posible balance entre actividades glucanasa y transglicosidasa (Cappellaro *et al.* 1998).

Se ha descrito que la proteína Xog1p además de la reacción exohidrolítica, cataliza una eficaz reacción de transglicosilación *in vitro* (Sullivan *et al.* 1990). Esencialmente, el mecanismo propuesto consiste en la rotura enzimática del enlace glicosídico por el extremo no reductor de la molécula de β -1,3-glucano, quedando el residuo terminal de glucosa en el sitio activo de la enzima hasta que la participación de una molécula de agua conduce a la hidrólisis o la glucosa es transferida a un aceptor (otra molécula de glucano), formándose entonces un nuevo enlace glicosídico de tipo β -1,3.



E = enzima

G_n = polímeros de n moléculas de glucosa

Recientemente, se ha observado que dicha reacción depende de la concentración de sustrato, pudiendo ser 10 veces más rápida que la reacción de hidrólisis si hay un exceso del mismo (Stubbs *et al.* 1999). Como éstas son las condiciones que quizá se dan en las zonas de crecimiento y formación de la pared celular, se podría especular que en estas regiones, tanto las exo- β -glucanasas como las endo- β -glucanasas podrían actuar como transferasas, llevando a cabo la reorganización de las cadenas lineales de β -glucano sintetizadas inicialmente por la glucano sintasa. Así pues, podría suceder que entre Xog1p y Eng1p existiera un balance entre actividades hidrolíticas y de transferencia que hiciesen que un mutante $\Delta eng1 xog1$ no manifestara un fenotipo de fácil detección. También podría suceder que la falta de ambas actividades desencadenara una ruta alternativa y se activaran otros genes de este tipo, por ejemplo CaEXG2, CaEXG3 u otros aun por identificar, cuyos productos compensaran el defecto observado, permitiendo la construcción de una pared celular estable. Sería deseable, en este sentido, la purificación de la proteína CaEng1p para poder valorar *in vitro* sus actividades hidrolítica y de transferencia.

Las diferencias observadas en la estirpe *xog1* podrían explicarse igualmente por un cambio en la organización de la pared celular. Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* se han descrito diversos mutantes afectados en genes de pared, en los que se observa un cambio en la distribución y proporción relativa de los distintos polímeros que integran esta estructura. Así, mutantes $\Delta gas1$ de *S. cerevisiae* (Popolo *et al.* 1997), $\Delta phr1$ de *C. albicans* (Fonzi 1999) y $\Delta epd1$ de *C. maltosa* (Nakazawa *et al.* 1998), que tienen alterada la capacidad de formar enlaces β -1,3-glucano, presentan una mayor proporción de quitina en su pared celular como mecanismo de compensación. Este fenómeno también se observa en mutantes $\Delta bgl2$ de *C. albicans*, alterados en la actividad endoglucanasa y β -1,3-glucosiltransferasa (Hartland *et al.* 1991). Todos estos mutantes son, por tanto, más sensibles a compuestos como la nikomicina Z, que inhibe la síntesis de quitina, el blanco de calcoflúor, que se une a las cadenas nacientes de quitina impidiendo la cristalización y el ensamblaje de las microfibrillas, el rojo Congo y la zimoliasa, contrarrestando así el defecto en la síntesis de glucano. Un mecanismo semejante a este descrito podría actuar en mutantes *xog1*, como parece deducirse del mayor contenido de quitina en esta estirpe evidenciado mediante técnicas de microscopía confocal y de citometría de flujo (González Garcés *et al.* 1997). Esta nueva organización de la pared celular podría ser responsable incluso de alteraciones de permeabilidad a diferentes compuestos, que conduciría a alteraciones en la sensibilidad a compuestos como la higromicina B y el SDS. Esta hipótesis deberá ser analizada más exhaustivamente.

Finalmente, existe la posibilidad adicional de un problema de fondo genético y por tanto, que las diferencias observadas no fuesen debidas realmente a la delección de estos genes, sino a causas desconocidas hasta el momento consecuencia de la deriva genética de la cepa. Si bien en la delección de CaENG1 y XOG1 se ha partido de la cepa CAI4, el que la delección conjunta se haya realizado sobre una estirpe $\Delta eng1$ y no sobre

la estirpe *xog1* obtenida varios años antes (González Garcés *et al.* 1997), pudiera hacer que los procesos de recombinación que ha llevado a cabo la levadura para obtener los mutantes hayan sido diferentes y por tanto, que el fenotipo final observado sea diferente. Para intentar descartar esta posibilidad, en primer lugar, se analizaron varios transformantes de cada estirpe y en segundo lugar, se procedió a reintegrar el gen *CaENG1* en su locus en el mutante $\Delta eng1\ xog1$.

Tras la reintegración del gen *CaENG1* y el posterior análisis de la sensibilidad de varios transformantes de las distintas estirpes a los compuestos anteriormente mencionados (rojo Congo, blanco de calcoflúor, higromicina B y SDS), se pudo comprobar repetidamente y en experimentos independientes que todos los transformantes de una misma estirpe manifestaban un comportamiento semejante.

Así, los dos mutantes *xog1* analizados -obtenidos interrumpiendo secuencialmente los dos alelos en diferente orden (González Garcés *et al.* 1997)- eran muy sensibles a los compuestos ensayados. Todas las cepas mutantes $\Delta eng1\ xog1$ se comportaban como la cepa control CAF2 y las estirpes reintegrantes *ENG1* $\Delta eng1\ xog1$ recuperaban la sensibilidad a higromicina B y SDS, algo característico de un mutante sencillo *xog1*; no se observó recuperación de la sensibilidad ni a rojo Congo ni a blanco de calcoflúor (tabla 18). Para descartar un efecto de reducida expresión del gen *CaENG1*, se decidió integrar nuevamente este gen en la cepa $\Delta eng1\ xog1$ bajo la regulación de un promotor constitutivo y fuerte, que permitiese una sobreexpresión de *CaENG1* utilizándose para ello el promotor del gen *ACT1*.

Las estirpes en las que se reintegró el gen *CaENG1* bajo la regulación de *ACT1^{PR}*, recuperaron la sensibilidad a higromicina B y se manifestó hipersensibilidad a SDS pero, de nuevo, no se logró la recuperación de la sensibilidad a rojo Congo y blanco de calcoflúor manifestada en mutantes *xog1*. Estas cepas crecen, por otra parte, mucho más lentamente que la cepa de referencia (similarmemente a lo observado también en cepas de *S. cerevisiae* en las que se sobreexpresa el gen homólogo *ScENG1* (Baladrón García 1997)), quizá como consecuencia de la actividad hidrolítica de este enzima que debilitaría presumiblemente la pared.

El hecho de que estirpes que llevan reintegrado el gen *CaENG1* manifiesten solo la recuperación de algunos de los fenotipos observados, podría deberse a que el gen reintegrado no fuera completamente funcional; esta hipótesis es poco probable puesto que ha sido comprobada la correcta secuencia del gen mediante técnicas de PCR aunque no hemos llevado a cabo ensayos de actividad enzimática. También podría ocurrir que el gen *CaENG1* reintegrado solo compensara los fenotipos debidos a rojo Congo y blanco de calcoflúor si se encuentran reintegradas las dos copias del gen en su correspondiente zona cromosómica y no sobreexpresado a partir de la integración en el gen *LEU2* en que se ha llevado a cabo. En cualquier caso, los experimentos desarrollados no son concluyentes para diferenciar entre estos fenómenos.

La delección conjunta de *CaENG1* y *CaENG2* origina una estirpe que manifiesta una ligera sensibilidad a anfotericina B (del orden de 2 veces la CMI de la cepa CAF2),

una notable resistencia a nikomicina Z (entre 2 y 4 veces mayor que la cepa CAF2) y sensibilidad a higromicina B (tabla 18). Lo mismo sucede con la cepa $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$. Además, la estirpe $\Delta eng1 \Delta eng2$ en la que se ha reintegrado el gen *CaENG1* presenta la misma sensibilidad que las estirpes anteriormente mencionadas a higromicina B (tabla 18). Se podría especular que estos fenotipos son debidos principalmente a la delección del gen *CaENG2*, puesto que no han sido observados ni en un mutante $\Delta eng1$ ni en un mutante $\Delta eng1 xog1$. Sería importante la obtención de un mutante $\Delta eng2$ para verificar esta hipótesis.

La resistencia a nikomicina Z podría indicar quizá un menor contenido en quitina en la pared celular de estas cepas. Quizás CaEng2p, al igual que Xog1p, además de su posible función como endo- β -1,3-glucanasa también desempeñe un papel como transglicosidasa y tenga lugar un mecanismo compensatorio entre actividades hidrolíticas y de transferencia cuando hay delecionada más de una β -1,3-glucanasa. Ésta podría ser la causa del menor contenido en quitina de la pared celular, y por tanto, de la resistencia a nikomicina Z. La falta de otras actividades β -1,3-glucanasa pudiera desencadenar una ruta alternativa, activándose genes como *CaENG2* que quizá compensaran los defectos observados.

La mayor sensibilidad a higromicina B y a anfotericina B podría indicar una alteración en la funcionalidad de la membrana plasmática en estos mutantes o quizás una mayor permeabilidad celular que permita un acceso más fácil de estos compuestos. No puede descartarse que *CaENG2* también desempeñe un papel en el la polimerización de actina, como su homólogo en *S. cerevisiae* (Lechler and Li 1997), y que sea n las alteraciones de esta función las que originen de forma secundaria los fenotipos observados en pared celular.

3. El papel de *CaENG1* y *CaENG2* en la transición dimórfica y en la virulencia.

El proceso de **transición dimórfica** que se ha estudiado mediante diferentes aproximaciones no parece ser diferente entre las distintas estirpes analizadas y las cepas silvestre SC5314 y de referencia CAF2. Por tanto, ni *CaENG1* ni *CaENG2* ni *XOG1* parecen afectar este proceso, al menos en estas condiciones. Este comportamiento es relativamente frecuente en otras enzimas biosintéticas de la pared celular.

La relación entre genes de biosíntesis de pared y dimorfismo no es clara en los estudios desarrollados hasta el momento. Por ejemplo, la delección de quitina sintasas tampoco conduce a una disminución drástica de la formación de hifas, incluso existiendo una diferente expresión de las mismas en las diferentes fases del crecimiento, como en *Chs3p*, de expresión preferente en fase hifal (Mio *et al.* 1996). Respecto a *CHS2* existen discrepancias. Gow y cols. (Gow *et al.* 1994) muestran una reducción del 40 % en el contenido de quitina en la forma hifal de los mutantes $\Delta chs2$, mientras que Mio y cols. (Mio *et al.* 1996) encuentran un contenido similar de quitina en dichos mutantes. En

cualquier caso, ni *CHS2* ni *CHS3* parecen alterar el proceso de transición dimórfica de *C. albicans*.

Se han descrito varios genes que también se localizan en la pared celular y que se expresan específicamente en respuesta a la transición levadura-micelio: el gen *ECE1* (por *Extent of Cell Elongation*) (Birse *et al.* 1993), el gen *HYR1* (por *HYphally Regulated*) (Bailey *et al.* 1996), el gen *HWP1* (por *Hyphal Wall Protein*) (Staab *et al.* 1999) y los genes *RBT1* y *RBT5* (del inglés *Repressed By TUP1*) (Braun *et al.* 2000), que sin embargo, no son esenciales para la formación de hifas, como lo demuestra la ausencia de alteraciones morfológicas de los mutantes nulos. Hay otros genes de la pared celular de este hongo que se inducen en crecimiento hifal, pero sólo en condiciones determinadas. Por ejemplo, los genes *PHR1* y *PHR2* que codifican dos proteínas con actividad glucanosiltransferasa, y cuya expresión está modulada por el pH (Saporito-Irwin *et al.* 1995; Muhlschlegel and Fonzi 1997), juegan un papel esencial en morfogénesis aunque no están involucrados exactamente en el proceso de transición dimórfica. Otro ejemplo lo constituye el gen *ALS1* (por *Agglutinin-Like Sequence*), una glicoproteína de la pared celular implicada en adhesión que se induce en medio RPMI, pero que no está regulada por la transición levadura-micelio (Hoyer *et al.* 1995).

Se conocen igualmente otras proteínas de *C. albicans* implicadas en la construcción de la pared celular, cuya ausencia sí conduce a una disminución en el crecimiento hifal de la levadura o a defectos en la formación de hifas, aunque no son esenciales en el fenómeno de transición dimórfica. Es el caso de las enzimas que intervienen en el proceso de manosilación de las proteínas de la pared celular: Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p, Pmt5p y Pmt6p (por *Protein mannosyltransferases*), inician el proceso de O-glicosilación de las proteínas secretadas en hongos (Timpel *et al.* 1998; Timpel *et al.* 2000), y su delección produce defectos en el crecimiento hifal en ciertos medios sólidos (Prill *et al.* 2001). La proteína Mnn9p es necesaria para la N-glicosilación y su ausencia conduce a la formación de hifas aberrantes (Southard *et al.* 1999). Los mutantes en *INT1*, que codifica una proteína de la superficie de *C. albicans* semejante a las integrinas de mamíferos, carecen de crecimiento hifal en algunos medios (Gale *et al.* 1998).

Nuestros datos experimentales junto con los descritos en esta memoria sobre otros genes de la pared celular de *C. albicans* sugieren que, el cambio de levadura a micelio es un fenómeno muy complejo, en el que intervienen numerosas proteínas con funciones muy diversas y actividades redundantes.

El papel de las glucanasas en **virulencia** se analizó igualmente mediante el estudio de las cepas delecionadas. Para establecer el papel de un gen como determinante de virulencia, es necesario clonarlo, generar una cepa delecionada y demostrar que este mutante debe ser incapaz de producir infección en un modelo experimental adecuado o, al menos, manifestar una drástica reducción de la virulencia. Por último, la reintroducción del gen mediante manipulación genética en la cepa, debiera restaurar la virulencia de la cepa silvestre (Falkow 1988).

El modo más frecuente empleado para valorar la patogenicidad de un posible determinante es estudiar la letalidad producida por la inoculación en la vena lateral de la cola del ratón. Este ensayo podría quizá considerarse como un modelo de candidiasis diseminada. Estos estudios se pueden complementar con análisis histológicos y con la cuantificación de la carga fúngica en determinados órganos (estimada por las unidades formadoras de colonia en los órganos elegidos), para estimar el grado de invasión o destrucción de diferentes células, tejidos u órganos (Díez-Orejas *et al.* 1999). En nuestro caso, tras el análisis de los resultados obtenidos al realizar este tipo de estudios de virulencia, no aparecieron diferencias relevantes en la supervivencia de los ratones en ninguna de las cepas mutantes ensayadas respecto a la cepa de referencia y a la cepa silvestre. Además, el alojamiento de las levaduras en el riñón y el cerebro de las diferentes estirpes de ratón empleadas para las cepas $\Delta eng1$ y $\Delta eng1 xog1$, fue similar al de las estirpes SC5314 y CAF2. Se confirma un menor alojamiento de la cepa $xog1$ en el cerebro de los ratones más resistentes a la enfermedad, BALB/c (González Garcés *et al.* 1997). La pequeña diferencia observada en el alojamiento de la cepa $xog1$, aunque poco significativa, podría deberse a una posible alteración, ya mencionada, en la composición de los polímeros que integran la pared celular, que podría conducir a un cambio en la hidrofobicidad de la superficie del microorganismo o a una menor capacidad de adherencia a diversos tejidos, como por ejemplo al cerebro del ratón. Que este efecto no sea observado en la estirpe $\Delta eng1 xog1$ podría deberse al mecanismo compensatorio entre reacciones hidrolíticas y de transferencia que hemos considerado previamente.

El comportamiento de *CaENG1* y *CaENG2* es, pues similar al de otros genes implicados en la biosíntesis de la pared celular y existen varios casos descritos en los que la delección de enzimas biosintéticas de la pared celular no conllevan una notable reducción de la virulencia como *CHS2*, un gen involucrado en la biosíntesis de quitina (Gow *et al.* 1994), *BGL2*, una β -glucosiltransferasa (Sarthy *et al.* 1997) y *XOG1*, la exo- β -1,3-glucanasa mayoritaria (González Garcés *et al.* 1997). Los resultados son contradictorios para otra enzima encargada de la síntesis de quitina, *CHS3*, (Bulawa *et al.* 1995; Mio *et al.* 1996) mientras que son evidentes para *CHS1*, un gen esencial en el cual un mutante condicional bajo condiciones represoras en un modelo sistémico de infección experimental es avirulento (Munro *et al.* 2001). También existen genes que codifican proteínas involucradas en la construcción o el mantenimiento de la pared celular cuya carencia sí produce modificaciones en la virulencia de *C. albicans*. Así, *PHR1* y *PHR2* son importantes para la virulencia en modelos diferentes de infección experimental; este hecho se correlaciona con el grado de expresión de cada gen y por ello, con el pH del nicho ecológico en que se produce la infección (de Bernardis *et al.* 1998; Ghannoum *et al.* 1995). Otras proteínas posiblemente ancladas a la pared celular mediante un residuo de GPI son Rbt1p y Rbt5p. La virulencia de los mutantes $\Delta rbt1$ es menor, mientras que la de los mutantes $\Delta rbt5$ es igual que la de las cepas parentales (Braun *et al.* 2000). El gen específico de crecimiento hifal *HWP1* que también codifica una proteína con secuencias de unión al residuo GPI, actúa como un sustrato para la

transglutaminasa de mamíferos y su delección hace que las células sean incapaces de unirse establemente al epitelio bucal (Staab *et al.* 1999) y de mantener una infección en un modelo sistémico de ratón (Tsuchimori *et al.* 2000). Los genes involucrados en la manosiación de las proteínas también ejercen su papel en la virulencia. La disrupción individual de *PMT1*, *PMT6* y *MNT1* origina cepas menos virulentas. Además, mutantes $\Delta pmt1$ y $\Delta pmt6$ presentan una adhesión menor en cultivos de células epiteliales (Timpel *et al.* 1998; Timpel *et al.* 2000), y los mutantes $\Delta mnt1$ manifiestan una capacidad menor de adhesión tanto a células humanas de la mucosa bucal como a células epiteliales de la vagina de rata (Buurman *et al.* 1998)

Estos resultados, de nuevo confirman que el papel de proteínas de pared implicadas en virulencia es muy variado, y sugiere que en muchos casos existe redundancia funcional.

4. Análisis in silicio de *CaENG1* y *CaENG2*: una nueva familia de β -glucanasas.

Las hidrolasas del β -glucano de origen fúngico han sido objeto de estudio de varios grupos de investigación desde hace años. Ya se ha comentado en los resultados de esta memoria la elevada similitud de las proteínas codificadas por los genes *CaENG1* y *CaENG2* con las proteínas ScEng1p y ScEng2p de *S. cerevisiae*, Eng1p de *A. fumigatus* y SpEng1p y SpEng2p de *S. pombe* que hemos clasificado como endo- β -1,3-glucanasas. Esta actividad ha sido demostrada en el caso de las proteínas de *S. cerevisiae* y de la proteína de *A. fumigatus* y será necesario confirmarla en el resto de las proteínas.

CaEng1p y ScEng1p presentan un péptido señal en el extremo aminoterminal, característico de aquellas proteínas que entran en la ruta de secreción. Además, las dos proteínas poseen un dominio rico en residuos de serina y treonina, típico de las proteínas que se anclan a la membrana plasmática o de aquellas que se secretan al exterior celular. Teniendo en cuenta estos rasgos comunes y conociendo experimentalmente que ScEng1p se secreta mayoritariamente al espacio periplásmico y luego al medio de cultivo (Baladrón García 1997), podríamos especular que CaEng1p codifica una endo- β -1,3-glucanasa que fundamentalmente es secretada al espacio periplásmico y posteriormente al medio de cultivo. Análogamente, CaEng2p, al igual que su homólogo en *S. cerevisiae* no presenta una región hidrofóbica en el extremo aminoterminal indicativo de la existencia de una secuencia señal, ni tiene una región rica en residuos de serina y treonina. Puede hipotetizarse que *CaENG2* codifica una endo- β -1,3-glucanasa aunque serían necesarios estudios de actividad hidrolítica utilizando compuestos como laminarina (sustrato lineal de β -1,3-glucano) (Molina *et al.* 1987) y pustulán (sustrato lineal de β -1,6-glucano) para comprobar, en primer lugar, que se trata de glucanasas y en segundo lugar, la especificidad del enlace que hidrolizan. También se requerirían experimentos de actividad hidrolítica empleando pNPG (compuesto hidrolizable por enzimas de tipo β -glucosidasa) (Molina *et al.* 1987) y laminarina oxidada para confirmar la posible actividad endohidrolítica. Este compuesto

tiene bloqueado el extremo no reductor de las moléculas por oxidación con periodato, lo que impide su ataque por parte de enzimas que retiren restos de glucosa a partir de este extremo -exoglucanasas- y solamente es hidrolizado por enzimas capaces de romper enlaces internos de la molécula -endoglucanasas.

Puesto que disponemos de una cepa de *C. albicans* delecionada en tres glucanasas: $\Delta eng1 \Delta eng2 xog1$, ensayos de actividad glucanásica en fracciones de paredes celulares, sobrenadantes de extractos celulares y sobrenadantes de caldos de cultivo de esta estirpe transformada, bien con *CaENG1* bien con *CaENG2*, nos permitiría conocer la localización de cada proteína y valorar la aportación individual de las mismas a la actividad glucanásica. También sería deseable la purificación de ambas proteínas, lo que permitiría una confirmación de diversos aspectos como la posible existencia de un procesamiento proteolítico, el procesamiento del péptido señal, la determinación del peso molecular de la proteína madura, etc.

Como ya se mencionó en el apartado de Resultados, respecto al grupo de las exo- β -1,3-glucanasas de levaduras, la única homología significativa de *CaEng1p* y *CaEng2p* corresponde a dos aminoácidos que son considerados como pertenecientes al centro de unión al sustrato: la segunda histidina y la tirosina del bloque D-H-H-H-Y (Esteban *et al.* 1999), aunque con una ligera modificación al estar intercalada una fenilalanina entre la segunda y tercera histidina (D-H-H-F-H-Y). En la figura 60 se ha alineado la región correspondiente a esta secuencia en varias β -glucanasas para mostrar que, curiosamente, en las proteínas *CaEng1p* y *CaEng2p*, este bloque presenta "características híbridas" de modo que, por una parte, se respetan las tres histidinas presentes en las exo- β -1,3-glucanasas y, por otra parte, aparece la fenilalanina intercalada como en las 1,4-glucanasas (celulasas).

En todas las endo- β -1,3-glucanasas mencionadas aparece la fenilalanina intercalada aunque, curiosamente, la segunda histidina que se encuentra conservada en todas las exo y endo- β -1,3-glucanasas de levaduras ha sido reemplazada por ácido aspártico en *CaEng1p* y la tirosina que también aparece conservada en todas las exo y endo- β -1,3-glucanasas de levaduras se encuentra reemplazada por un triptófano en *SpEng2p*. Hasta el momento no disponemos de datos que nos permitan afirmar que *CaEng1p* posee actividad β -1,3-glucanasa y pudiera suceder que la sustitución de la histidina por el ácido aspártico haya tenido consecuencias sobre la actividad de la proteína, de modo que *CaEng1p* sea incapaz de actuar sobre β -1,3-glucano, y por eso no se puede apreciar ningún fenotipo al delecionar únicamente el gen *CaENG1*. En cualquier caso, serían necesarios experimentos de mutagénesis dirigida para confirmar estas hipótesis.

Basándonos en los análisis de secuencias aminoácidicas llevados a cabo y en todas las observaciones experimentales realizadas en algunas de las endo- β -1,3-glucanasas, es posible especular que, al igual que las exo- β -1,3-glucanasas constituyen una familia de proteínas altamente conservadas en levaduras, las proteínas *CaEng1p* y *CaEng2p* junto a sus homólogos en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *A. fumigatus*, pudieran ser miembros de otro grupo de enzimas con actividad sobre el β -glucano. De

hecho, al finalizar la escritura de esta memoria, se ha advertido que el servidor sobre las enzimas que actúan en carbohidratos (CAZy) (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZy/db.html>) ha actualizado sus datos incluyendo una nueva familia de glicosil hidrolasas, la número 81, que está integrada por enzimas con actividad endo- β -1,3-glucanasa, y que incluye las dos endoglucanasas de *S. cerevisiae* (YNR067c y YLR144c), las dos de *S. pombe* (SPAC23D3.10c y SPAC821.09), las dos de *C. albicans* (CaENG1 y CaENG2), la β -1,3-glucanasa de *A. fumigatus*, dos proteínas de *Arabidopsis thaliana* (F15H18.17 y F1N13_10) y una proteína de la planta de soja que interacciona con un compuesto de β -glucano de la pared celular de un hongo fitopatógeno (β -glucan-elicitor receptor).

Por otro lado, ScEng2p identificada también como Acf2p o Pca1p (Lechler and Li 1997), presenta una zona rica en residuos de prolina en el extremo N-terminal que serían posibles dominios SH3 y que también aparece en CaEng2p. Además, ScEng2p posee en el extremo C-terminal dos dominios tipo “pleckstrin” (PH) Usando el programa bioinformático SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>) para la búsqueda de dominios proteicos definidos, no se ha localizado ningún dominio tipo PH en CaEng2p, lo que no confirma su inexistencia, ya que podría ocurrir que los posibles dominios PH no se ajustasen exactamente a la secuencia consenso establecida. De hecho, de los dos dominios tipo “pleckstrin” que se localizan en Pca1p, solo uno de ellos coincide con la secuencia consenso. Resulta atractivo especular que CaEng2p pudiera también tener un papel relevante en la polimerización de la actina. El citoesqueleto de actina es importante tanto para el crecimiento celular como para el mantenimiento de la forma. Los diferentes procesos morfogénéticos requieren que la maquinaria que controla la dinámica cortical de la actina sea capaz de responder a las señales celulares, de localizarse en regiones específicas de la corteza celular y de polimerizar los filamentos de actina para formar super-estructuras. Estos procesos implican que en los lugares donde tiene lugar la polimerización de actina existan grupos de proteínas constituidos, no sólo por aquellas proteínas estructurales que modulan el comportamiento dinámico de los filamentos de actina, sino también por proteínas que puedan integrar las señales procedentes de varias cascadas reguladoras.

Serán necesarios estudios posteriores para verificar la posible implicación de CaEng2p en estos procesos.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Exg1p	D	H	H	-	H	Y
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Exg2p	D	H	H	-	H	Y
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ssg1p	D	H	H	-	H	Y
<i>Candida albicans</i>	Xog1p	D	H	H	-	H	Y
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eng1p	D	H	H	F	H	Y
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eng2p	D	H	H	F	H	Y
<i>Candida albicans</i>	Eng1p	D	H	D	F	H	Y
<i>Candida albicans</i>	Eng2p	D	H	H	F	H	Y
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Eng3p	D	H	H	F	H	Y
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Eng2p	D	H	H	F	H	W
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Eng1p	D	H	H	F	H	Y
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	EGEC	T	L	H	F	-	Y
<i>Clostridium thermocelum</i>	EGCT	N	F	H	F	-	Y
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	EGCA	T	C	H	F	-	Y

Figura 60: Bloque de histidinas: D-H-H-H-Y.

Comparación de la secuencia de aminoácidos de una zona que interviene en el supuesto centro de unión al sustrato de las exo- β -1,3-glucanasas y las endo- β -1,3-glucanasas de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, las endo- β -1,3-glucanasas de *S. pombe* y *A. fumigatus*, y algunas endo- β -1,4-glucanasas de la familia A de celulasas.

5. Consideraciones finales.

Las expectativas iniciales generadas ante el estudio de los genes *CaENG1* y *CaENG2* respecto a la identificación de una función clara de las proteínas que codifican en los procesos morfogénicos de la levadura, y su posible empleo como diana

antifúngica, no se han visto reflejadas en evidencias experimentales que permitan determinar el papel biológico de estas proteínas en la modificación controlada de la envoltura celular. Así, los diversos mutantes obtenidos en los genes *CaENG1*, *CaENG2* y *XOG1* individualmente y en diferentes combinaciones, son casi indistinguibles de sus cepas parentales en cuanto a capacidad de crecimiento, capacidad de filamentación, virulencia e incluso en cuanto a alteraciones en la pared celular.

La redundancia génica que parece presentar *C. albicans* y otras levaduras como *S. cerevisiae* en los genes que intervienen en la formación de la pared, y que se traduce en la existencia de más de un polipéptido con la misma actividad o similar, dificulta claramente la asignación de una determinada función a una proteína concreta. Esta redundancia refleja la importancia de la pared celular fúngica en el mantenimiento de la integridad celular, constituyendo un mecanismo destinado a preservar esta estructura. La existencia de varios genes que codifican enzimas con actividad 1,3- β -glucanásica es un ejemplo de ello. En *S. cerevisiae* y por extensión en *C. albicans*, el sistema de degradación del β -glucano se consideró sencillo inicialmente y, sin embargo, se ha ido convirtiendo en un sistema muy complejo en el que intervienen también enzimas que, además de la función hidrolítica, realizan una función de transferencia y que desempeñan un papel fundamental tanto en la conformación del β -glucano como en la interconexión del mismo con los restantes polímeros que integran la pared celular. De hecho, sería muy interesante profundizar en el modo de acción de las proteínas *CaENG1* y *CaENG2* y considerar una posible actividad glucosiltransferasa como ocurre para la exo-1,3- β -glucanasa codificada por el gen *XOG1* (Chambers *et al.* 1993).

Otra aproximación interesante sería el estudio detallado de la composición (mediante fraccionamiento de los polímeros de la pared) y de la estructura (análisis de interacción de polímeros, microscopía electrónica) en mutantes defectivos en estas enzimas y en estirpes donde se combine la mutación en estos genes, con la mutación en otros, cuyos productos participan en la síntesis y el ensamblaje de la envoltura celular. Por ejemplo, genes implicados en la síntesis del β -glucano (*KRE*, *FKS*), de la quitina (*CHS*) y genes implicados en el entrecruzamiento de polímeros de la pared (*PHR*, *BGL2*).

Otro aspecto importante en el futuro sería el estudio de la regulación de la síntesis de estas enzimas, del que pueden derivarse datos importantes en el esclarecimiento de su función biológica. La demostración de que *ScEXG1* y *ScBGL2* son dianas finales de rutas de transducción de señales implicadas en la integridad celular (Jiang *et al.* 1995; Shimizu *et al.* 1994), abre un campo de gran interés para situar la actuación de enzimas como *CaENG1* y *CaENG2* en los procesos morfogénicos, en respuesta a estímulos externos. La disponibilidad, en nuestro grupo de trabajo, de mutaciones que afectan a componentes de estas rutas en *C. albicans*, hace posible la construcción de fondos genéticos donde estudiar la expresión de todos los genes de β -glucanasas caracterizados.

La relación entre *ScENG2* y el fenómeno de polimerización de actina abre igualmente posibilidades muy interesantes. Tradicionalmente el estudio de la pared

celular se ha basado en el análisis de mutantes frágiles, sensibles a determinados compuestos u osmóticamente inestables. Los últimos avances en el conocimiento de la regulación de la biosíntesis de los polímeros de la pared tienden a integrar este proceso en un contexto fisiológico más amplio, como consecuencia de reordenamientos del citoesqueleto que a su vez responden a estímulos determinados por las condiciones ambientales. Un ejemplo de esto puede ser la identificación de *RHO1*, un gen involucrado en la regulación de reordenamientos citoesqueléticos, como la subunidad reguladora de la β -1,3-glucano sintasa (Qadota *et al.* 1996). Quizás un estudio más profundo del papel de *CaENG2* nos ayude a mostrar la conexión entre la pared celular y los procesos morfogenéticos.

Ahora que disponemos de la secuencia completa del genoma de *C. albicans* (www-sequence.stanford.edu/group/Candida/), el reto al que nos enfrentamos consiste en desvelar la relación estructura-función, las interacciones funcionales que existen entre los productos de los diversos genes caracterizados y la identificación de nuevos genes que puedan ser dianas para el desarrollo de nuevos antifúngicos. Respecto a los genes involucrados en la pared celular, métodos de localización junto a aproximaciones genéticas como el análisis *in silicio* del genoma de la levadura, el rastreo a gran escala de fenotipos relacionados con la pared en colecciones de mutantes, el análisis de la expresión de los diferentes genes y las técnicas proteómicas, constituyen sistemas de gran ayuda para caracterizar nuevos genes de la pared celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El gen *CaENG1* es dispensable tanto para el crecimiento vegetativo como para llevar a cabo el proceso de transición dimórfica en *C. albicans*, como lo demuestran los estudios realizados en medios inductores de la filamentación tanto sintéticos como naturales.
2. Los mutantes $\Delta Caeng1$ no presentan una diferente susceptibilidad a antibióticos y compuestos de distinta naturaleza que actúan interfiriendo con la síntesis o el ensamblaje de los componentes de la pared celular, ni tienen alterados diversos parámetros celulares como el contenido de proteínas y lípidos totales, el potencial de la membrana mitocondrial y la actividad peroxidasa citosólica.
3. El gen *CaENG1* no contribuye significativamente a la virulencia de *C. albicans* en un modelo murino de infección experimental, siendo las cepas $\Delta eng1$ tan virulentas (estimada por la tasa de supervivencia y alojamiento en órganos infectados) como las parentales CAF2 (*URA3/ura3*) o SC5314 (*URA3/URA3*) de las que procede.
4. La delección conjunta de *CaENG1* y *XOG1*, *CaENG1* y *CaENG2*, y *CaENG1*, *CaENG2* y *XOG1* no afecta ni al crecimiento vegetativo ni a la capacidad de llevar a cabo la transición dimórfica de *C. albicans*. Las estirpes $\Delta Caeng1 xog1$, $\Delta Caeng1 \Delta Caeng2$ y $\Delta Caeng1 \Delta Caeng2 xog1$ son, igualmente, tan virulentas como las cepas SC5314 y CAF2.
5. Los genes *CaENG1*, *CaENG2* y *XOG1* parecen intervenir en la formación de la pared celular de *C. albicans*, como se deduce de la supresión de determinados fenotipos detectados en mutantes alterados en la actividad glucanásica mayoritaria de la célula (*xog1*) y de los fenotipos de sensibilidad a compuestos que interfieren con la síntesis o el ensamblaje de los componentes de la misma, en mutantes delecionados en dichos genes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aljinovic, G. and Pohl, T. M. (1995). Sequence and analysis of 24 kb on chromosome II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 475-479.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Díez-Orejas, R., Gustin, M. C., Pla, J., Sánchez, M., and Nombela, C. (1999). Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. 1999. *J. Bacteriol.*, **181**: 3058-3068.
- Au-Young, J. and Robbins, P. W. (1990). Isolation of a chitin synthase gene (*CHS1*) from *Candida albicans* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **4**, 197-207.
- Ausubel, F. M., Kingston, R. E., Brent, R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1993). 'Current protocols in molecular biology.' (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience: New York.)
- Bailey, D. A., Feldmann, P. J. F., Bovey, M., Gow, N. A. R., and Brown, A. J. P. (1996). The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *Journal of Bacteriology* **178**, 5353-5360.
- Baird, S. D., Hefford, M. A., Johnson, D. A., Sung, W. L., Yaguchi, M., and Seligy, V. L. (1990). The Glu residue in the conserved Asn-Glu-Pro sequence of two highly divergent endo-beta-1,4-glucanases is essential for enzymatic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **169**, 1035-1039.
- Baladrón García, V. (1997). Caracterización de los genes *ENG1* y *ENG2* que codifican endo-1,3-β-glucanasas en *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de Salamanca. Tesis.
- Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S., and Ballou, C. E. (1991). Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* **88**, 3209-3212.
- Birse, C. E., Irwin, M. Y. , Fonzi, W. A., and Sypherd, P. S. (1993). Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infection and Immunity* **61**, 3648-3655.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S., and Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031.
- Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., and Celis, J. E. (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* **15**, 529-539.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* **154**, 164-175.
- Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A., and Bussey, H. (1990). Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol.* **110**, 1833-1843.
- Boone, C., Sdicu, A., Laroche, M., and Bussey, H. (1991). Isolation from *Candida albicans* of a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* *KRE1* gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis. *Journal of Bacteriology* **173**, 6859-6864.

- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X., and Johnson, A. D.** (2000). Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.
- Brown, J. L. and Bussey, H.** (1993). The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol Cell Biol.* **13**, 6346-6356.
- Bucher, P.** (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol.* **212**, 563-578.
- Bulawa, C. E., Miller, D. W., Henry, L. K., and Becker, J. M.** (1995). Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of U.S.A.* **92**, 10570-10574.
- Bulawa, C. E., Slater, M. L., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L., and Robbins, P. W.** (1986). The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* **46**, 213-225.
- Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. P., Odds, F. C., and Gow, N. A. R.** (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **95**, 7670-7675.
- Cabib, E., Bowers, B., and Roberts, R. L.** (1983). Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **80**, 3318-3321.
- Cabib, E., Silverman, S. J., and Shaw, J. A.** (1992). Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen.Microbiol* **138** (Pt 1), 97-102.
- Calderone, R. A.** (1993). Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends in Microbiology* **1**, 55-58.
- Cappellaro, C., Mrsa, V., and Tanner, W.** (1998). New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *Journal of Bacteriology* **180**, 5030-5037.
- Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den, E. H., and Klis, F. M.** (1997). *In silicio* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477-1489.
- Cenamor, R., Molina, M., Galdona, J., Sánchez, M., and Nombela, C.** (1987). Production and secretion of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucanases: differences between protoplast and peryplasmic enzymes. *Journal of General Microbiology* **133**, 619-628.
- Cenamor, R.** (1988). Producción y secreción de 1,3- β -glucanasas en *Saccharomyces cerevisiae*: diferencias entre enzimas intracitoplasmáticas y periplásmicas. Universidad Complutense de Madrid. Tesis.
- Chambers, R. S., Broughton, M. J., Cannon, R. D., Carne, A., Emerson, G. W., and Sullivan, P. A.** (1993a). An exo-beta-(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *Journal of General Microbiology* **139**, 325-334.
- Chambers, R. S. and Sullivan, P. A.** (1993b). Expression of the exoglucanase gene in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *FEMS Microbiological Letters* **111**, 63-67.
- Chapman, T., Kinsman, O. S., and Houston, J.** (1992). Chitin biosynthesis in *Candida albicans* grown in vitro and in vivo and its inhibition by nikkomycin Z. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1909-1914.
- Chen-Wu, J. L., Zwicker, J., Bowen, A. R., and Robbins, P. W.** (1992). Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **6**, 497-502.

- Chinen, T., Qureshi, M. H. , Koguchi, Y., and Kawakami, K.** (1999). *Candida albicans* suppresses nitric oxide (NO) production by interferon-gamma (IFN-gamma) and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine peritoneal macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* **115**, 491-497.
- Choi, W.-J., Santos, B., Durán, A., and Cabib, E.** (1994). Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranscriptional level? *Molecular and Cellular Biology* **14**, 7685-7694.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I.** (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.
- Chu, W. S., Magee, B. B., and Magee, P. T.** (1993). Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *Journal of Bacteriology* **175**, 6637-6651.
- Cid, V. J., Alvarez, A., Santos, A. I., Nombela, C., and Sánchez, M.** (1994). Yeast exo-beta-glucanases can be used as efficient and readily detectable reporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 747-756.
- Cid, V. J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., and Sánchez, M.** (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **59**, 345-386.
- Correa, J., Vazquez de Aldana, C. R., San Segundo, P., and del Rey, F.** (1992). Genetic mapping of 1,3- β -glucanase-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **22**, 238-288.
- Correa, J.** (1993). Caracterización del gen *EXG2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de Salamanca. Tesis.
- Cutfield, S. M., Davies, G. J., Murshudov, G., Anderson, B. F., Moody, P. C., Sullivan, P. A., and Cutfield, J. F.** (1999). The structure of the exo-beta-(1,3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases. *Journal of Molecular Biology* **294**, 771-783.
- de Backer, M. D., Magee, P. T., and Pla, J.** (2000). Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu.Rev.Microbiol* **54**, 463-498.
- de Bernardis, F., Muhlschlegel, F. A., Cassone, A., and Fonzi, W. A.** (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. **66** (7), 3317-3325.
- de Groot, P., Hellingwerf, K., and Klis, F.** Identification of *Candida albicans* cell wall proteins and their incorporation in response to varying environmental conditions. 2001. Conference Proceeding. Human Fungal Pathogens. Seefeld. Austria.
- de la Fuente, J. M., Alvarez, A., Nombela, C., and Sánchez, M.** (1992). Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* **8**, 39-45.
- de la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., Llobell, A., and Romero, L. C.** (1995a). A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* **177**, 6937-6945.
- de la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., and Llobell, A.** (1995b). Purification and characterization of an endo-beta-1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J Bacteriol.* **177**, 1864-1871.
- de la Cruz, J. and Llobell, A.** (1999). Purification and properties of a basic endo-beta-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* **265**, 145-151.
- Dean, N.** (1995). Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 1287-1291.

- del Rey, F., Santos, T., Garcia-Acha, I., and Nombela, C. (1979). Synthesis of 1,3-beta-glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during the mitotic cycle, mating, and sporulation. *Journal of Bacteriology* **139**, 924-931.
- del Rey, F., Santos, T., Garcia-Acha, I., and Nombela, C. (1980). Synthesis of beta-glucanases during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*: formation of a new, sporulation-specific 1,3-beta-glucanase. *Journal of Bacteriology* **143**, 621-627.
- Delbruck, S. and Ernst, J. F. (1993). Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **10**, 859-866.
- Díez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-García, F., Pla, J., Nombela, C., and Sánchez-Pérez, M. (1997). Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for a mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infection and Immunity* **65**, 833-837.
- Díez-Orejas, R., Molero, G., Ríos-Serrano, I., Vázquez, A., Gil, C., Nombela, C., and Sánchez-Pérez, M. (1999). Low virulence of a morphological *Candida albicans* mutant. *FEMS Microbiol Lett.* **176**, 311-319.
- Dijkgraaf, G. J., Brown, J. L., and Bussey, H. (1996). The *KNH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*. *Yeast* **12**, 683-692.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**, 6127-6143.
- el-Sherbeini, M. and Clemas, J. A. (1995). Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 200-207.
- Elango, N., Correa, J. U., and Cabib, E. (1982). Secretory character of yeast chitinase. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 1398-1400.
- Esteban, P. F., Vázquez de Aldana, C. R., and del Rey, F. (1999a). Cloning and characterization of 1,3-beta-glucanase-encoding genes from non-conventional yeasts. *Yeast* **15**, 91-109.
- Esteban, P. F., Casarégola, S., Vázquez de Aldana, C. R., and del Rey, F. (1999b). Cloning and characterization of the *EXG1* gene from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **15**, 1631-1644.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev.Infect.Dis.* **10 Suppl 2**, S274-S276.
- Farkas, V., Biely, P., and Bauer, S. (1973). Extracellular beta-glucanases of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Biophysics Acta* **321**, 246-255.
- Fontaine, T., Hartland, R. P., Diaquin, M., Simenel, C., and Latge, J. P. (1997a). Differential patterns of activity displayed by two exo-beta-1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Bacteriology* **179**, 3154-3163.
- Fontaine, T., Hartland, R. P., Beauvais, A., Diaquin, M., and Latge, J. P. (1997b). Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Biochemistry* **243**, 315-321.
- Fonzi, W. A. and Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Fonzi, W. A. (1999). *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol.* **181**, 7070-7079.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., and Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* **279**, 1355-1358.
- Garrett-Engele, P., Moilanen, B., and Cyert, M. S. (1995). Calcineurin, the

- Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁺-ATPase. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4103-4114.
- Gavel, Y. and von Heijne, G.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**, 433-442.
- Ghannoum, M. A. and Abu-Elteen, K.** (1991). Adherence of *Candida albicans*: influencing factors and mechanism(s). In 'Candida albicans cellular and molecular biology'. (Ed. R. Prasad.) pp. 144-63. (Springer-Verlag: Berlín.)
- Ghannoum, M. A., Spellberg, B., Saporito-Irwin, S. M., and Fonzi, W. A.** (1995). Reduced virulence of *Candida albicans* *PHR1* mutants. *Infection and Immunity* **63**, 4528-4530.
- Ghannoum, M. A. and Rice, L. B.** (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol Rev.* **12**, 501-517.
- Giaimis, J., Lombard, Y., Poindron, P., and Muller, C. D.** (1994). Flow cytometry distinction between adherent and phagocytized yeast particles. *Cytometry* **17**, 173-178.
- Gibson, T. J., Hyvonen, M., Musacchio, A., Saraste, M., and Birney, E.** (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 349-353.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H., and Kirsch, D. R.** (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Molecular and General Genetics* **198**, 179-182.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., and Fink, G. R.** (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.
- Goldman, R. C., Sullivan, P. A., Zakula, D., and Capobianco, J. O.** (1995). Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *European Journal of Biochemistry* **227**, 372-378.
- González Garcés, M. M.** (1998). Caracterización funcional del gen *XOG1* que codifica una Exo-β-(1,3)-glucanasa en *Candida albicans*. Universidad Complutense de Madrid. Tesis.
- González Garcés, M. M., Díez-Orejas, R., Molero, G., Alvarez, A. M., Pla, J., Nombela, C., and Sánchez-Pérez, M.** (1997). Phenotypic characterization of a *Candida albicans* strain deficient in its major exoglucanase. *Microbiology* **143**, 3023-3032.
- Gow, N. A. R., Robbins, P. W., Lester, J. W., Brown, A. J. P., Fonzi, W. A., Chapman, T., and Kinsman, O. S.** (1994). A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of U.S.A.* **13**, 6216-6220.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., and Kitada, K.** (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen. Genet.* **258**, 53-59.
- Hanahan, D.** (1988). Techniques for transformation of *E. coli*. In 'DNA cloning'. (Ed. D. M. Glover.) pp. 109-35. (IRL Press: Oxford.)
- Hartland, R. P., Emerson, G. W., and Sullivan, P. A.** (1991). A secreted beta-glucan-branching enzyme from *Candida albicans*. *Proc R.Soc.Lond.B.Biol Sci* **246**, 155-160.
- Harvath, L. and Terle, D. A.** (1994). Assay for oxidative metabolism. *Methods Mol.Biol.* **34**, 281-287.
- Hazen, K. C.** (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiological Reviews* **8**, 462-478.

- Hector, R. F., Domer, J. E., and Carrow, E. W.** (1982). Immune responses to *Candida albicans* in genetically distinct mice. *Infection and Immunity* **38**, 1020-1028.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., and Jacoby, J. J.** (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **32**, 671-680.
- Henrissat, B., Claeyssens, M., Tomme, P., Lemesle, L., and Mornon, J. P.** (1989). Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* **81**, 83-95.
- Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **280** (Pt 2), 309-316.
- Henrissat, B. and Bairoch, A.** (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **293** (Pt 3), 781-788.
- Hernández, M. L., Regidor, J., Gil, C., Pla, J., y Nombela, C.** (1995) Análisis molecular de la resistencia múltiple a drogas en *Candida albicans*. Conferencia. XV Congreso Nacional de Microbiología. Madrid. España.
- Herreros, E., García-Sáez, M. I., Nombela, C., and Sánchez, M.** (1992). A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Molecular Microbiology* **6**, 3567-3574.
- Hodgson, V. J., Button, D. , and Walker, G. M.** (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology* **141**, 2003-2012.
- Hong, Z., Mann, P., Brown, N. H., Tran, L. E., Shaw, K. J., Hare, R. S. , and Di Domenico, B. J.** (1994). Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involves in (1,3)- β -glucan synthesis. *Mol. Cell Biol* **14**, 1017-1025.
- Hoyer, L. L., Scherer, S., Shatzman, A. R., and Livi, G. P.** (1995). *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Molecular Microbiology* **15**, 39-54.
- Hoyer, L. L., Payne, T. L. , and Hecht, J. E.** (1998a). Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol.* **180**, 5334-5343.
- Hoyer, L. L., Payne, T. L. , Bell, M., Myers, A. M. , and Scherer, S.** (1998b). *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Current Genetics* **33**, 451-459.
- Hutchins, K. and Bussey, H.** (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1,6)- β -D-glucan. *J Bacteriol.* **154**, 161-169.
- Igual, J. C., Johnson, A. L., and Johnston, L. H.** (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor SWI4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO Journal* **15**, 5001-5013.
- Inoue, S. B., Takewaki, N. , Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., and Watanabe, T.** (1995). Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **231**, 845-854.
- Ishiguro, J., Saitou, A., Duran, A., and Ribas, J. C.** (1997). *cps1+*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J Bacteriol.* **179**, 7653-7662.
- Jiang, B., Ram, A. F. J., Sheraton, J., Klis, F. M., and Bussey, H.** (1995). Regulation of cell wall β -glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Molecular and General Genetics* **248**, 260-269.

- Jung, U. S. and Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Molecular Microbiology* **34**, 1049-1057.
- Kalebina, T. S., Laurinavichyute, D. K., Shevelev, A. B., Fominov, G. V., Levitin, E. I., Alekseeva, O. V., Chzhan, S., Pan'kova, N. V., Ksenzenko, V. N., Stepanov, V. M., and Kulaev, I. S. (1998). Purification and characterization of P33 protein of *Candida utilis* homologous to bgl2p of *Saccharomyces cerevisiae*; comparative analysis of the role of these proteins in molecular organization of the yeast cell walls. *Biochemistry* **63**, 1419-1423.
- Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., Matsumoto, H., Maeda, H., and Hagihara, Y. (1995). Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infection and Immunity* **63**, 984-988.
- Kandasamy, R., Vedyappan, G., and Chaffin, W. L. (2000). Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiological Letters* **186**, 239-243.
- Kanik-Ennulat, C., Montalvo, E., and Neff, N. (1995). Sodium orthovanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show defects in Golgi-mediated protein glycosylation, sporulation and detergent resistance. *Genetics* **140**, 933-943.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J., Van den Ende, H., and Klis, F. M. (1995). Covalent association of β -1,3-glucan with β -1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **177**, 3788-3792.
- Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., van den, E. H., Llobell, A., Cabib, E., and Klis, F. M. (1997). Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol.* **179**, 6279-6284.
- Kapteyn, J. C., van den, E. H., and Klis, F. M. (1999a). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochemistry and Biophysics Acta* **1426**, 373-383.
- Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., van den, E. H., Makarow, M., and Klis, F. M. (1999b). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Microbiology* **31**, 1835-1844.
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., van den, E. H., and Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecular Microbiology* **35**, 601-611.
- Kasahara, S., Yamada, H., Mio, T., Shiratory, Y., Miyamoto, C., Yabe, T., Nakajima, T., Ichishima, E., and Furuichi, Y. (1994). Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits β -glucan synthesis. *Journal of Bacteriology* **176**, 1488-1499.
- Keating, G. M. and Jarvis, B. (2001). Caspofungin. *Drugs* **61**, 1121-1129.
- Klebl, F. and Tanner, W. (1989). Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **171**, 6259-6264.
- Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., and Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall: the linkage between chitin and β (1-3)-glucan. *Journal of Biological Chemistry* **3**, 1170-1178.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., and Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol.Chem.* **272**, 17762-17775.

- Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M., and Watanabe, T. (1997). Cloning of the *RHO1* gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *Journal of Bacteriology* **179**, 7734-7741.
- Kopecka, M. and Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol* **158**, 115-126.
- Köhler, G. A., White, T. C., and Agabian, N. (1997). Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *Journal of Bacteriology* **179**, 2331-2338.
- Kuranda, M. J. and Robbins, P. W. (1987). Cloning and heterologous expression of glycosidase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of U.S.A.* **84**, 2585-2589.
- Kuranda, M. J. and Robbins, P. W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **266**, 19758-19767.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-132.
- Lechler, T. and Li, R. (1997). In vitro reconstitution of cortical actin assembly sites in budding yeast. *Journal of Cell Biology* **138**, 95-103.
- Lee, B. N. and Elion, E. A. (1999). The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96**, 12679-12684.
- Lee, K. L., Buckley, H. R. , and Campbell, C. C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **13**, 148-153.
- Lipke, P. N. and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* **180**, 3735-3740.
- Liu, H., Köhler, J., and Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**, 1723-1726.
- Lora, J. M., de la, C. J., Llobell, A., Benitez, T., and Pintor-Toro, J. A. (1995). Molecular characterization and heterologous expression of an endo-beta-1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* . *Molecular and General Genetics* **247**, 639-645.
- Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, J. L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H., and Lipke, P. N. (1995). Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol.* **128**, 333-340.
- Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A. E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M. H. (2001). Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol.Chem.* **276**, 35875-35882.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di, P. T. , Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Roemer, T. W., Vo, D. H., Bondoc, D. C., Hall, J., Zhong, W. W., Sdicu, A. M., Davies, J., Klis, F. M., Robbins, P. W., and Bussey, H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.
- Lussier, M., Sdicu, A. M., Shahinian, S., and Bussey, H. (1998). The *Candida albicans* *KRE9* gene is required for cell wall beta-1, 6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **95**, 9825-9830..

- Macarron, R., van Beeumen, J., Henrissat, B., de, I. M., I, and Claeysens, M.** (1993). Identification of an essential glutamate residue in the active site of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters* **316**, 137-140.
- Mackenzie, L. F., Brooke, G. S., Cutfield, J. F., Sullivan, P. A., and Withers, S. G.** (1997). Identification of Glu-330 as the catalytic nucleophile of *Candida albicans* exo-beta-(1,3)-glucanase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 3161-3167.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H.** (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**, 554-558X.
- Martín, H., Rodríguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M.** (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol.Chem.* **275**, 1511-1519.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., and Foor, F.** (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 5671-5681.
- Mazur, P. and Baginsky, W.** (1996). *In vitro* activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP- binding protein Rho1. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14604-14609.
- McCreath, K. J., Specht, C. A., and Robbins, P. W.** (1995). Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of U.S.A.* **92**, 2544-2548.
- McCreath, K. J., Specht, C. A., Liu, Y., and Robbins, P. W.** (1996). Molecular cloning of a third chitinase gene (*CHT1*) from *Candida albicans*. *Yeast* **12**, 501-504.
- Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H.** (1996). Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **178**, 2416-2419.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S. B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., and Yamada-Okabe, H.** (1997a). Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/*FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *Journal of Bacteriology* **179**, 4096-4105.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H.** (1997b). Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* *KRE6* and *SKN1*: expression and physiological function. *Journal of Bacteriology* **179**, 2363-2372.
- Molina, M., Cenamor, R., and Nombela, C.** (1987). Exo-1,3-beta-glucanase activity in *Candida albicans*: effect of the yeast-to-mycelium transition. *Journal of General Microbiology* **133**, 609-617.
- Molina, M., Cenamor, R., Sanchez, M., and Nombela, C.** (1989). Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3-beta-glucanase. *Journal of General Microbiology* **135 (Pt 2)**, 309-314.
- Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., and Nombela, C.** (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microscopy Research and Technique* **51**, 601-612.
- Mormeneo, S., Marcilla, A. , Iranzo, M., and Sentandreu, R.** (1994). Structural mannoproteins released by beta-elimination from *Candida albicans* cell walls. *FEMS Microbiological Letters* **123**, 131-136.
- Mouyna, I., Hartland, R. P., Fontaine, T., Diaquin, M., Simenel, C., Delepierre, M., Henrissat, B., and Latge, J. P.** (1998). A 1,3-beta-glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology* **144 (Pt 11)**, 3171-3180.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo,**

- L., Hartland, R. P., and Latge, J. P.** (2000a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 14882-14889.
- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B., and Latge, J. P.** (2000b). Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochemical Journal* **347 Pt 3**, 741-747.
- Mrsa, V., Ugarkovic, T., and Barbaric, S.** (1992). Binding of *Saccharomyces cerevisiae* extracellular proteins to glucane. *Arch.Biochem.Biophys.* **296**, 569-574.
- Mrsa, V., Klebl, F., and Tanner, W.** (1993). Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *Journal of Bacteriology* **175**, 2102-2106.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M., and Tanner, W.** (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1154.
- Muhlschlegel, F. A. and Fonzi, W. A.** (1997). *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol.Cell Biol.* **17**, 5960-5967.
- Munro, C. A., Schofield, D. A., Gooday, G. W., and Gow, N. A.** (1998). Regulation of chitin synthesis during dimorphic growth of *Candida albicans*. *Microbiology* **144 (Pt 2)**, 391-401.
- Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J., Bulawa, C. E., and Gow, N. A.** (2001). Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Molecular Microbiology* **39**, 1414-1426.
- Muthukumar, G., Suhng, S. H., Magee, P. T., Jewell, R. D., and Primerano, D. A.** (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* *SPR1* gene encodes a sporulation-specific exo-1,3- β -glucanase which contributes to ascospore thermotolerance. *Journal of Bacteriology* **175**, 386-394.
- Nagahashi, S., Lussier, M., and Bussey, H.** (1998). Isolation of *Candida glabrata* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* *KRE9* and *KNH1* genes and their involvement in cell wall beta-1,6-glucan synthesis. *J Bacteriol.* **180**, 5020-5029.
- Nakazawa, T., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M.** (1998). Isolation and characterization of *EPD1*, an essential gene for pseudohyphal growth of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *J Bacteriol.* **180**, 2079-2086.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Proposed standard M27-P. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, Pa.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Pla, J., and Nombela, C.** (1995). Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 2197-2206.
- Navarro-García, F., Sanchez, M., Nombela, C., and Pla, J.** (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev.* **25**, 245-268.
- Navas, J. and Beguin, P.** (1992). Site-directed mutagenesis of conserved residues of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelC. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189**, 807-812.
- Nebreda, A. R., Vazquez, C. R., Villa, T. G., Villanueva, J. R., and del Rey, F.** (1987). Heterogeneous glycosylation of the *EXG1* gene product accounts for the

- two extracellular exo-beta-glucanases of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **220**, 27-30.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., and Nombela, C.** (1997). Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 297-302.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Nilsson, I. and von Heijne, G.** (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17338-17343.
- Odds, F. C.** (1988). 'Candida and candidosis.' 2 Edn. (Baillière Tindall: London.)
- Odds, F. C.** (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News* **60**, 313-318.
- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., and Nakase, T.** (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acids Research* **21**, 4039-4045.
- Orlean, P.** (1997). Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In 'The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cell cycle and cell biology.' (Eds. J. Pringle, J. Broach, and E. Jones.) pp. 229-362. (Cold Spring Harbor: New York.)
- Ovalle, R., Lim, S. T., Holder, B., Jue, C. K., Moore, C. W., and Lipke, P. N.** (1998). A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* **14**, 1159-1166.
- Pallotti, C., Iranzo, M., Cañizares, J. V. y Mormeneo, S.** (2000). Disrupción de los genes de quitinasa 2 y 3 de *Candida albicans*. Conferencia. V Congreso Nacional de Micología. Cáceres. España.
- Papadimitriou, J. M. and Ashman, R. B.** (1986). The pathogenesis of acute systemic candidiasis in a susceptible inbred mouse strain. *J Pathol.* **150**, 257-265.
- Park, K. S., Kang, K. C., Kim, K. Y., Jeong, P. Y., Kim, J. H., Adams, D. J., Kim, J. H., and Paik, Y. K.** (2001). HWY-289, a novel semi-synthetic protoberberine derivative with multiple target sites in *Candida albicans*. *J Antimicrob.Chemother.* **47**, 513-519.
- Pla, J., Pérez-Díaz, R. M., Navarro-García, F., Sánchez, M., and Nombela, C.** (1995). Cloning of the *Candida albicans* *HIS1* gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene* **165**, 115-120.
- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M., and Nombela, C.** (1996). Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* **12**, 1677-1702.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., and Vai, M.** (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *gcp1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**, 463-469.
- Popolo, L. and Vai, M.** (1998). Defects in assembly of the extracellular matrix are responsible for altered morphogenesis of a *Candida albicans* *phr1* mutant. *Journal of Bacteriology* **180**, 163-166.
- Popolo, L. and Vai, M.** (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochemistry and Biophysics Acta* **1426**, 385-400.
- Posas, F. and Saito, H.** (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702-1705.
- Prill, S., Timpel, C., Weber, Y., and Ernst, J.** (2001). The protein mannosyl transferase- (Pmt)-family in the human pathogen *Candida albicans*: role in O-glycosylation, morphogenesis, antifungal resistance and virulence. Conference

- Proceeding. International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis. Monte Verità, Ascona. Switzerland.
- Pringle, J.** (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* **194**, 732-735.
- Py, B., Bortoli-German, I., Haiech, J., Chippaux, M., and Barras, F.** (1991). Cellulase EGZ of *Erwinia chrysanthemi*: structural organization and importance of His98 and Glu133 residues for catalysis. *Protein Eng* **4**, 325-333.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E., and Ohya, Y.** (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase. *Science* **272**, 279-281.
- Ram, A. F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., and Klis, F. M.** (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019-1030.
- Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van den, E. H., and Klis, F. M.** (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol.* **180**, 1418-1424.
- Ramírez, M., Hernandez, L. M., and Larriba, G.** (1989). A similar protein portion for two exoglucanases secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol* **151**, 391-398.
- Rayner, J. C. and Munro, S.** (1998). Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol.Chem.* **273**, 26836-26843.
- Reiser, V., Ruis, H., and Ammerer, G.** (1999). Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1147-1161.
- Rodriguez-Peña, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J., and Nombela, C.** (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol.* **20**, 3245-3255.
- Roemer, T. and Bussey, H.** (1991). Yeast beta-glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **88**, 11295-11299.
- Roemer, T., Delaney, S., and Bussey, H.** (1993). *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Mol Cell Biol.* **13**, 4039-4048.
- Romani, L., Mocci, S., Bietta, C., Lanfaloni, L., Puccetti, P., and Bistoni, F.** (1991). Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infection and Immunity* **59**, 4647-4654.
- Roncero, C. and Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol.* **163**, 1180-1185.
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C., and Durán, A.** (1988). Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **170**, 1945-1949.
- Saija, A., Princi, P., Trombetta, D., Lanza, M., and De Pasquale, A.** (1997). Changes in the permeability of the blood-brain barrier following sodium dodecyl sulphate administration in the rat. *Exp.Brain Res.* **115**, 546-551.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). 'Molecular cloning: a laboratory manual.' (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.)

- San Segundo, P., Correa, J., Vazquez de Aldana, C. R., and del Rey, F.** (1993). SSG1, a gene encoding a sporulation-specific 1,3- β -glucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **175**, 3823-3837.
- Santos, T., del Rey, F., Conde, J., Villanueva, J. R., and Nombela, C.** (1979). *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in exo-1,3-beta-glucanase production. *Journal of Bacteriology* **139**, 333-338.
- Sanz, M., Trilla, J. A., Duran, A., and Roncero, C.** (2001) The control of chitin biosynthesis in yeast. Conference Proceeding. Human Fungal Pathogens. Seefeld. Austria.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypher, P. S., and Fonzi, W. A.** (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 601-613.
- Sarthy, A. V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D. J., Meulbroek, J. A., and Goldman, R. C.** (1997). Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the *BGL2* gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology* **143**, 367-376.
- Sburlati, A. and Cabib, E.** (1986). Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol.Chem.* **261**, 15147-15152.
- Schaeffer, H. J., Leykam, J., and Walton, J. D.** (1994). Cloning and targeted gene disruption of *EXG1*, encoding exo-beta 1, 3-glucanase, in the phytopathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 594-598.
- Senet, J. M.** (1998). *Candida* adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. *International Microbiology* **1**, 117-122.
- Shahinian, S. and Bussey, H.** (2000). Beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **35**, 477-489.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G. J., Sdicu, A. M., Thomas, D. Y., Jakob, C. A., Aebi, M., and Bussey, H.** (1998). Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149**, 843-856.
- Shapiro, H. M.** (1993). Trends and developments in flow cytometry instrumentation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **677**, 155-166.
- Shapiro, H. M.** (1994). Cell membrane potential analysis. *Methods Cell.Biol.* **41**, 121-133.
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A., and Cabib, E.** (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* **114**, 111-123.
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B.** (1986). 'Methods in Yeast Genetics.' 1 Edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.)
- Shimizu, J., Yoda, K., and Yamasaki, M.** (1994). The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, which regulates expression of β -glucanase. *Molecular and General Genetics* **242**, 641-648.
- Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. L., and Cabib, E.** (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **85**, 4735-4739.
- Slutsky, B., Buffo, J., and Soll, D. R.** (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**, 666-669.
- Smits, G.J., Kapteyn, J. C. , Van den Ende, H., and Klis, F. M.** (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* **2**, 348-352.
- Soll, D. R.** (1990). Dimorphism and high-frequency switching in *Candida albicans*. In 'The genetics of *Candida*'. (Eds. D. R. Kirsch, R. Kelly, and M. B. Kurtz.) pp.

- 147-76. (CRC Press: Boca Raton, Florida.)
- Southard, S. B., Specht, C. A., Mishra, C., Chen-Weiner, J., and Robbins, P. W.** (1999). Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *MNN9*, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. *J Bacteriol.* **181**, 7439-7448.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B.** (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol. Cell* **9**, 3273-3297.
- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L., and Sundstrom, P.** (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**, 1535-1538.
- Stubbs, H. J., Brasch, D. J., Emerson, G. W., and Sullivan, P. A.** (1999). Hydrolase and transferase activities of the beta-1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. *European Journal of Biochemistry* **263**, 889-895.
- Sudoh, M., Nagahashi, S., Doi, M., Ohta, A., Takagi, M., and Arisawa, M.** (1993). Cloning of the chitin synthase 3 gene from *Candida albicans* and its expression during yeast-hyphal transition. *Molecular and General Genetics* **241**, 351-358.
- Sudoh, M., Watanabe, M., Mio, T., Nagahashi, S., Yamada-Okabe, H., Takagi, M., and Arisawa, M.** (1995). Isolation of *canCHS1A*, a variant gene of *Candida albicans* chitin synthase. *Microbiology* **141**, 2673-2679.
- Sudoh, M., Tatsuno, K., Ono, N., Ohta, A., Chibana, H., YamadaOkabe, H., and Arisawa, M.** (1999). The *Candida albicans* *CHS4* gene complements a *Saccharomyces cerevisiae* *skt5/chs4* mutation and is involved in chitin biosynthesis. *Microbiology* **145** (Pt 7), 1613-1622.
- Sugiyama, H., Ohkuma, M., Masuda, Y., Park, S. M., Ohta, A., and Takagi, M.** (1995). *In vivo* evidence for non-universal usage of the codon CUG in *Candida maltosa*. *Yeast* **11**, 43-52.
- Sullivan, P. A., Emerson, G. W., Broughton, M. J., and Stubbs, H. J.** (1990) Transglucosylation catalysed by the exo-beta-glucanase of *Candida albicans*. Conference Proceeding. *Candida and Candidamycosis*. FEMS Symposium N° 50. New York.
- Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R., and Kurtz, M.** (1999). A glucan synthase *FKS1* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol.* **181**, 444-453.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K., and Ernst, J. F.** (1998). Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol.Chem.* **273**, 20837-20846.
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K., and Ernst, J.** (2000). Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **182**, 3063-3071.
- Tkacz, J. S. and DiDomenico, B.** (2001). Antifungals: what's in the pipeline. *Curr.Opin.Microbiol* **4**, 540-545.
- Tsuchimori, N., Sharkey, L. L., Fonzi, W. A., French, S. W., Edwards, J. E., Jr., and Filler, S. G.** (2000). Reduced virulence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infection and Immunity* **68**, 1997-2002.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., and Ishida, I.** (1997). The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 1029-1034.
- Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E., and Durán, A.** (1991). *CAL1*, a gene required for activity of chitin

- synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **114**, 101-109.
- Valdivieso, M. H., Duran, A., and Roncero, C.** (1999). Chitin synthases in yeast and fungi. In 'Chitin and Chitinases.' (Eds. Jollès P. and Muzzarelli R.A.A.) pp. 55-69. (Birkhäuser Verlag: Basel.)
- Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A., and Popolo, L.** (2000). Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **182**, 4752-4757.
- van de Rhee, Mendes, O., Werten, M. W., Huizing, H. J., and Mooibroek, H.** (1996). Highly efficient homologous integration via tandem exo-beta-1, 3-glucanase genes in the common mushroom, *Agaricus bisporus*. *Current Genetics* **30**, 166-173.
- Vázquez de Aldana, C. R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Navarro-García, F., Mendez, E., and del Rey, F.** (1991). Nucleotide sequence of the exo-1,3- β -glucanase encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **97**, 173-182.
- Vázquez de Aldana, C. R., Martín Cuadrado, A. B., Dueñas, E., y del Rey, F.** (2000) 1,3- β -glucanasas de levaduras y su participación en procesos morfogénicos. Conferencia. V Congreso Nacional de Micología. Cáceres. España.
- Vázquez de Aldana, C. R., Martín Cuadrado, A. B., Dueñas, E., García, S., Ufano, S., and del Rey, F.** (2001) Yeast 1,3- β -glucanases, a conserved family of proteins, and their roles in morphogenesis. Conference Proceeding. International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis. Monte Verità, Ascona. Switzerland.
- Walker, G. M., McLeod, A. H., and Hodgson, V. J.** (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiological Letters* **127**, 213-222.
- Wang, Q., Tull, D., Meinke, A., Gilkes, N. R., Warren, R. A., Aebersold, R., and Withers, S. G.** (1993). Glu280 is the nucleophile in the active site of *Clostridium thermocellum* CelC, a family A endo-beta-1,4-glucanase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 14096-14102.
- Weig, M., Haynes, K., Rogers, T. R., Kurzai, O., Frosch, M., and Muhlschlegel, F. A.** (2001). A GAS-like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* **147**, 2007-2019.
- Whelan, W. L. and Soll, D. R.** (1982). Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Molecular and General Genetics* **187**, 477-485.
- Yamamoto, T., Hiratani, T., Hirata, H., Imai, M., and Yamaguchi, H.** (1986). Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Letters* **197**, 50-54.
- Yokogawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Mori, M., Ohama, T., Kuchino, Y., Yoshinari, S., Motoki, I., Nishikawa, K., and Osawa, S.** (1992). Serine tRNA complementary to the nonuniversal serine codon CUG in *Candida cylindracea*: evolutionary implications. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of U.S.A.* **89**, 7408-7411.
- Yu, L., Lee, K. K., Sheth, H. B., Lane-Bell, P., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Paranchych, W., Hodges, R. S., and Irvin, R. T.** (1994). Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity* **62**, 2843-2848.
- Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M. S., and Levin, D. E.** (1998). Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1013-1022.

ANEXO

Low virulence of a morphological *Candida albicans* mutant

Rosalía Díez-Orejas ^a, Gloria Molero ^a, Inmaculada Ríos-Serrano ^a,
Amalia Vázquez ^b, Concha Gil ^a, César Nombela ^a, Miguel Sánchez-Pérez ^{b,*}

^a Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^b Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 12 February 1999; received in revised form 11 May 1999; accepted 17 May 1999

Abstract

The virulence of *Candida albicans* 92', a morphological mutant unable to filament, was assayed in an experimental model of systemic candidiasis in three strains of mice with different susceptibilities to the infection. The mortality parameters studied pointed to the low virulence of this mutant strain. Study of the fungal load of *C. albicans* 92' in kidneys and brain revealed the presence of low numbers of CFUs and a high percentage of clearance, particularly in the brain. Adhesion studies demonstrated a reduced capability of the mutant to adhere to human epithelial cells. This strain can be considered a potential tool for cloning genes involved in virulence. © 1999 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Candida albicans*; Mutant strain; Virulence

1. Introduction

Candida albicans is an opportunistic pathogen of increasing relevance in the incidence of candidiasis in immunocompromised hosts [1]. A number of factors are thought to influence the virulence of this fungus [2,3]. Among them are its ability to undergo the dimorphic switch from a budding yeast to a hyphal form [4] and its adhesion capacity [5,6]. Although some strains of *C. albicans* are partially defective in hyphal development [7–9] or adhesion [10,11] and its virulence has been assayed [9–11], only two mutant

strains that fail to form filaments in response to serum or other inducers of filamentous growth have been considered avirulent in a mouse infection model [7,8].

In this work, we study the virulence of the morphological mutant *C. albicans* 92', a non-filamenting strain isolated in our laboratory [12]. To assess the relationship between the low virulence of the mutant and its adhesion ability, we evaluated the adhesion of *C. albicans* 92' in comparison to the wild-type. Adhesion was tested in vitro by flow cytometry.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms, culture and infection conditions

C. albicans 1001 (also ATCC 64385) was obtained

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 (91) 3941744; Fax: +34 (91) 3941745; E-mail: misanper@gugu.usal.es

from the Spanish Type Culture Collection (Department of Microbiology, University of Valencia, Spain).

C. albicans 92' is a morphological mutant obtained in an earlier screening in which *C. albicans* 1001 cells were treated with UV light (640 erg mm^{-2}); the survival rate was 80% [12]. Sugar utilisation patterns determined with an API 20C AUX gallery (API system) showed that *C. albicans* 1001 and 92' had the same pattern of sugar fermentation. The mutation is genetically stable over long periods of time (>200 generations) and the strain maintains its phenotype after serial passage in broth culture and after recovery from the organs of mice.

The morphological mutant *C. albicans* 92' gave rise to pointed colonies, different from the wild-type ones (Fig. 1A,B), and failed to produce mycelia under the conditions usually employed to induce hyphal morphogenesis in wild-type strains, such as Lee medium or media with inducers such as *N*-acetylglucosamine or proline (Fig. 1C,D). 92' blastospores were unable to form hyphae in horse/human serum at 37°C . No further phenotypic alteration in the usual pattern of blastoconidial development by budding was observed (data not shown). The growth rates (measured as glucose consumption [13]) of both 1001 and 92' were similar when incubated in human serum at 37°C (data not shown).

For infection studies, parental and mutant strains were grown at 30°C in YED agar plates (1% Difco yeast extract, 2% glucose, and 2% agar). After 24 h, cells were harvested, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and diluted to the desired density in the same buffer for injection into the lateral tail vein of the mice at a volume of 0.5 ml.

2.2. Mice

The mouse strains used were inbred BALB/c, DBA/2 and the hybrid (BALB/c \times DBA/2) CD2F₁. Both male and female mice, ranging in age from 12 to 16 weeks and with a weight of about 18 g, were used in the virulence studies. All animal studies were carried out at the Animal Facilities of the School of Medicine at the Universidad Complutense of Madrid.

2.3. Quantification of yeast cells in kidneys and brains and histological examination

Kidneys and brains from individual mice were removed aseptically and placed in a tissue homogeniser with 5 ml and 3 ml of PBS, respectively. The number of viable yeast units in the specimens (six to eight mice per group) was determined by a plate dilution method, using YED/chloramphenicol [14]. Results (means \pm S.D.) were expressed as log CFU per mouse. For histological studies, tissues were excised and immediately fixed in formaldehyde, and sections (3–4 μm) of paraffin-embedded tissues were stained with PAS reagent or haematoxylin/eosin [15].

2.4. Adhesion analysis

The method used was a modification from the cytometric assay described by Polacheck et al. [16].

2.4.1. Yeast labelling

Optimal labelling conditions were the following: 2×10^7 yeast cells ml^{-1} treated with $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ of FITC for 30 min. Then, cells were washed twice with PBS and diluted to the appropriate concentration.

2.4.2. Epithelial cells preparation

Two human cell lines were used for the adherence assays: HeLa (ATCC CCL2) (cervical epithelial cells) and Henle-407 (ATCC CCL6) (intestinal epithelial cells). Henle-407 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and HeLa cells were maintained in RPMI, both supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU penicillin and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin. Growth was performed at 37°C in a humidified 5% CO_2 -95% air incubator. Prior to exposure to the yeasts, cells were transferred to 100-mm Petri dishes and grown for 24 h, to 75% confluence. Cells were then washed three times with PBS and immediately prior to adherence assays, monolayers of cells were treated or not with cytochalasin D ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) for 1 h at 37°C .

2.4.3. Adherence reaction

In the adherence reaction, 5×10^5 epithelial cells

were mixed with yeast cells at different epithelial cell:yeast ratios (1:10, 1:50 or 1:100). The yeast/epithelial cell mixtures and control tubes containing only yeasts or only epithelial cells were incubated at 37°C for 60 min. Afterwards, the adherence reaction mixtures were washed twice with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde for 10 min and washed again twice with PBS. Then, cells were collected for flow cytometric analyses.

2.4.4. Flow cytometry assays

A FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson), calibrated routinely for immunofluorescence analysis, was used to determine the fluorescence intensities of yeasts and epithelial cells. The excitation wavelength was 488 nm, and emitted light was collected. Data were analysed with CellQuest software (Becton-Dickinson).

3. Results

3.1. Course of infection in BALB/c, CD2F₁ and DBA/2 mice

Three inbred strains of mice (BALB/c, DBA/2 and the hybrid CD2F₁) exhibiting different patterns of susceptibility to candidiasis were infected intravenously with four different doses of 1001 or 92' blastospores: 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 and 5×10^4 . The course of infection was monitored by the mortality parameters and the level of fungal load in the most representative organs: brain and kidney [17]. Fig. 2 shows that at the highest doses (1×10^7 , 1×10^6) of 1001 all the mice died within a few days. At the lower doses, chronic infection was observed in strains BALB/c and CD2F₁ but not in the susceptible DBA/2 mice, all of which died of an acute infection. No mortality was observed in BALB/c and CD2F₁ mice upon inoculation with similar doses of *C. albicans* 92', whereas 10–15% of DBA/2 mice died upon infection with the highest dose. Using the PRESTA statistical program (F.I.S. Spain) [18], the Cox proportional hazards model for survival data (Cox regression) was applied. After this statistical analysis, the results obtained can be assumed to be representative. The strain of *C. albicans* significantly modified survival; the risk of death was much lower

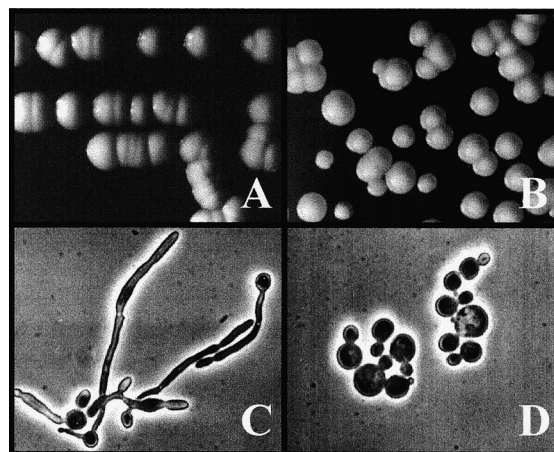


Fig. 1. Colonial and cellular morphology of *C. albicans* 1001 (A, C) and 92' (B, D). Cells were incubated in foetal calf serum at 37°C for 5 h.

with the mutant than the parental strain (RR-CI95: 0.001–0.011).

3.2. Quantitation of *C. albicans* viable units and histology

The degree of fungal load in kidneys and brains of infected mice is shown in Table 1. As can be observed, the number of CFUs recovered from the kidneys of the mice infected with 1×10^7 and 1×10^6 blastospores of strain 1001 was very high (log CFU 5–6) and was similar among the three strains of mice. Under these experimental conditions, all the mice died. At doses of 1×10^5 and 5×10^4 , the degree of fungal load depended on the strain of mice (DBA/2 > CD2F₁ > BALB/c). After challenge with 1×10^7 and 1×10^6 blastospores of strain 92', clearance of infection was observed in more than 60% of the population, while the rest had log CFU values of 2–3, notably lower than that obtained in *C. albicans* 1001 infection. When the 1×10^5 and 5×10^4 doses were used, renal clearance was observed in 100% of the mice. These results were identical for all three strains of mice.

Challenge with the 1×10^7 and 1×10^6 doses of strain 1001 afforded log CFU values of 3–4 in brain, while a log CFU of about 2 was observed following inoculation of the low doses. By contrast, strain 92', regardless of the dose or the strain of mice, produced

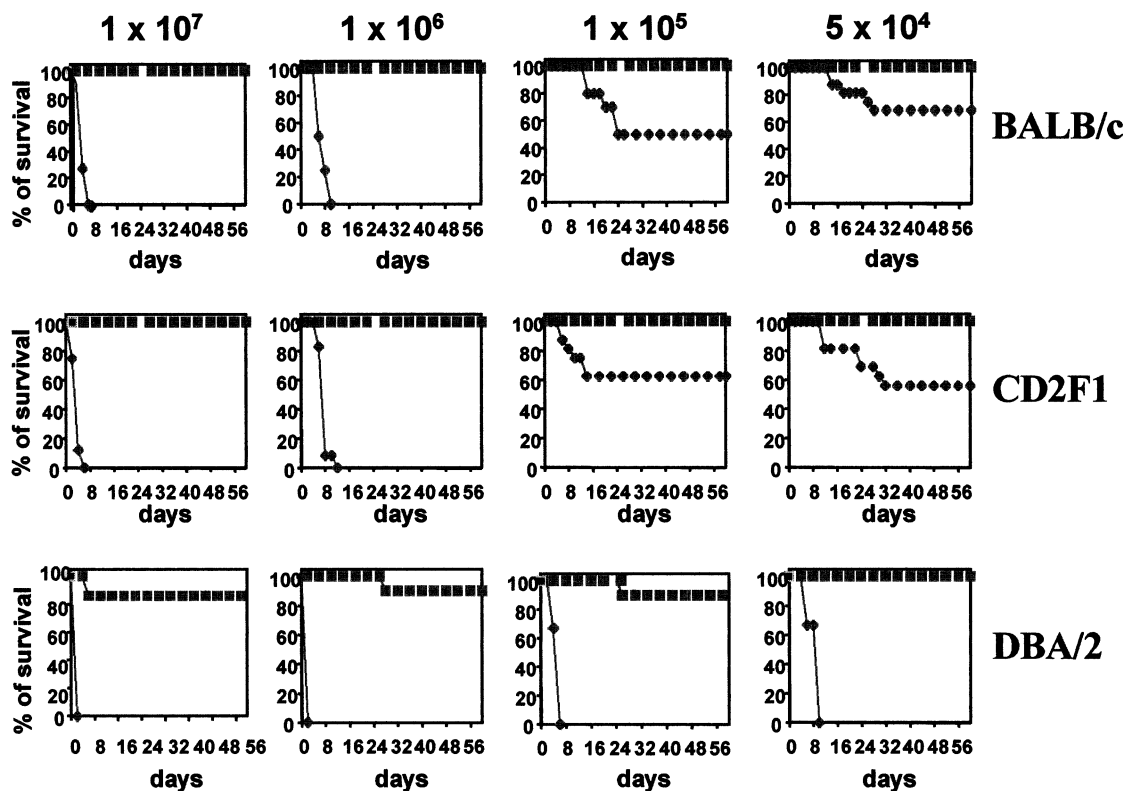


Fig. 2. Curves of survival from the three strains of mice used when injected with *C. albicans* 1001 (♦) or 92' (■).

clearance of the infection in the brains of all the mice inoculated (Table 1).

Histological analyses of the kidneys were performed at different days post challenge. On day +1, the 1001 strain was able to colonise the renal pelvis, a prominent inflammatory reaction being seen throughout the renal tubules together with disorganisation of the glomeruli. In contrast, with the inoculation of strain 92', no alterations were observed (data not shown). Analyses on day +3 revealed the most striking differences: *C. albicans* 1001 induced very pronounced inflammatory foci, producing a severe destruction of renal tissue and the parenchyma, which killed the mice within 3 days (Fig. 3A1/A2). Contrariwise, at the same time of infection, the *C. albicans* 92' strain produced no alterations and the kidneys remained healthy (Fig. 3A3/A4), this persisted even after 60 days of infection (data not shown).

Histological examination of the brains of the mice infected with the 1001 strain pointed to a slight in-

flammatory reaction on day +1 that was increased by day +3 (Fig. 3B1/B2), while the 92' strain induced no alterations on days +1 and +3 (Fig. 3B3/B4).

3.3. Adherence of *C. albicans* 1001 and 92' to epithelial cells

A comparative adherence analysis of both *C. albicans* strains was performed with flow cytometry using two different epithelial cell lines (see Section 2.4). Prior to the adhesion reaction, the labelled yeasts and epithelial cells (not labelled) were analysed by flow cytometry, both affording a histogram with a single peak with higher and lower (basal) fluorescence, respectively (Fig. 4). In the adherence reaction, the adhesion of the labelled yeasts to the epithelial cells was reflected in a histogram with two peaks representing two subpopulations of epithelial cells: one without adherent yeasts (basal fluorescence of epithelial cells) and the other one with adherent yeasts, the latter population showing higher fluores-

cence intensity. Experiments were performed at different epithelial cell:yeast ratios: 1:10 (Fig. 4), 1:50 and 1:100. At the higher yeast cell concentrations (1:50 and 1:100), yeast aggregates were observed (data not shown).

Study of *C. albicans* 1001 adhesion revealed a peak of the fluorescent subpopulation corresponding to 56% of the epithelial cells (Henle-407), while the proportion of the low-fluorescence subpopulation (epithelial cells alone) decreased correspondingly with respect to the controls (Fig. 4A). In the case of the 92' strain, the percentage of epithelial cells bearing labelled yeasts was 36%, indicating a reduced

adhesion compare to the wild-type (Fig. 4B). The results obtained with HeLa cells were comparable (data not shown).

In order to check the accuracy of this assay, control analyses were done under conditions known to decrease yeast adherence to epithelial cells [16]. These conditions involved incubation of the labelled yeasts for 30 min at high temperature (56°C), which possibly inactivates *Candida* adhesins [19] and an adherence reaction performed at a low temperature (4°C), where the kinetics are very slow. Both treatments resulted in a reduced adherence of the yeasts to the epithelial cells, as demonstrated by the unal-

Table 1
Course of 92'/1001 infection in mice of three different strains^a

Dose	<i>C. albicans</i> strain	MTS	D/T	log CFU ^b	
				Kidney	Brain
BALB/c mice					
10 ⁷	1001	3	11/11	6.06 ± 0.40	4.48 ± 0.38
	92'	> 60	0/10	2.67 ± 0.28**	*
10 ⁶	1001	6	12/12	5.63 ± 0.58	4.22 ± 0.56
	92'	> 60	0/12	2.03 ± 0.31**	*
10 ⁵	1001	> 60	5/10	2.99 ± 1.21	1.89 ± 0.24
	92'	> 60	0/11	*	*
5 × 10 ⁴	1001	> 60	5/16	3.42 ± 1.45***	*
	92'	> 60	0/12	*	*
CD2F ₁ mice					
10 ⁷	1001	3	8/8	6.81 ± 0.12	4.68 ± 1.04
	92'	> 60	0/9	2.37 ± 0.37**	*
10 ⁶	1001	7	12/12	5.71 ± 0.13	3.90 ± 0.14
	92'	> 60	0/12	2.25 ± 0.20**	*
10 ⁵	1001	> 60	6/16	3.18 ± 1.03***	1.96 ± 0.18***
	92'	> 60	0/9	*	*
5 × 10 ⁴	1001	> 60	7/16	4.10 ± 1.61**	2.03 ± 0.45**
	92'	> 60	0/8	*	*
DBA/2 mice					
10 ⁷	1001	1	10/10	nt	nt
	92'	> 60	1/7	2.15 ± 0.40**	*
10 ⁶	1001	1	10/10	6.10 ± 0.34	3.92 ± 0.12
	92'	> 60	1/8	2.30 ± 0.40**	*
10 ⁵	1001	5	6/6	5.85 ± 0.53	2.84 ± 1.12
	92'	> 60	1/10	1.95 ± 0.24**	*
5 × 10 ⁴	1001	8	15/15	5.47 ± 0.48	2.02 ± 0.28
	92'	> 60	0/15	*	*

^aAge-matched mice were intravenously challenged with various doses of *C. albicans* 1001 and 92'. Median survival times (MST, days) and number of dead mice at 60 days over total animal tested (D/T) are shown.

^bParallel groups of mice infected as above were killed the day before the MST for CFU enumeration in their kidneys and brains. Values are presented as log CFU ± S.D. from mice that had not cleared infection. Clearance of infection: ***40%; **more than 60%; *100% of population, respectively. nt: not tested. Statistically different log CFU kidney ($P=0.000$) and log CFU brain ($P=0.000$) (ANOVA test by *C. albicans* strain; the following variables were significant in both kidney and brain ($P<0.00015$): time ($> \text{time} < \text{CFU}$), mouse strain (BALB/c $< \text{CFU}$), dose ($> \text{dose} > \text{CFU}$).

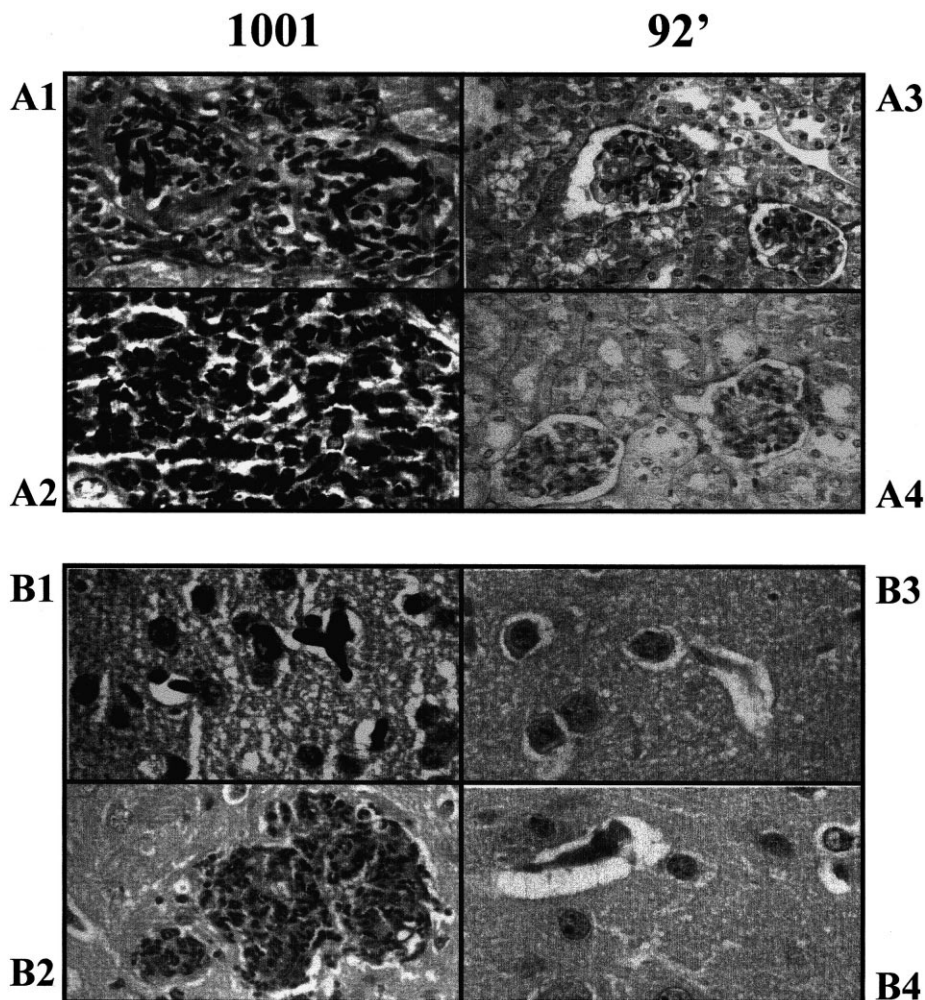


Fig. 3. Effects of infection on kidneys (A) and brains (B) from BALB/c mice infected with 1×10^6 cells of *C. albicans* 1001 and 92'. A1/A2: Tissue sections prepared from kidneys of mice infected with strain 1001 on days 1 (A1) and 3 (A2) post infection. A strong inflammatory reaction can be observed with the presence of *C. albicans* inside the tubules (haematoxylin/eosin; $\times 150$). A3/A4: Renal sections from mice infected with 92' on days 1 (A3) and 3 (A4) post infection. Neither lesions nor evidence of fungal growth can be observed (haematoxylin/eosin; $\times 150$). B1/B2: Tissue sections prepared from brains of mice infected with strain 1001 on days 1 (B1) and 3 (B2) post infection. A considerable degree of tissue damage and a high degree of fungal growth can be seen. B3/B4: Tissue sections from brains of mice infected with 92' on days 1 (B3) and 3 (B4) post infection. Neither lesions nor evidence of fungal growth can be observed (haematoxylin/eosin; $\times 150$).

tered proportion of the peak of the low-fluorescence subpopulation (Fig. 4). The similar behaviour observed with both yeast strains in all these control conditions reinforces the validity of these experiments. Another control involved carrying out the adherence reaction without cytochalasin D (Fig. 4). In this case, the decrease in the percentage of adhesion reflected a different susceptibility to phagocyto-

sis by the epithelial cells, depending on the *C. albicans* strain used: 34% for 1001 and 46% for 92'.

4. Discussion

The virulence of *C. albicans* 92', a morphological mutant unable to form hyphae under all filament-

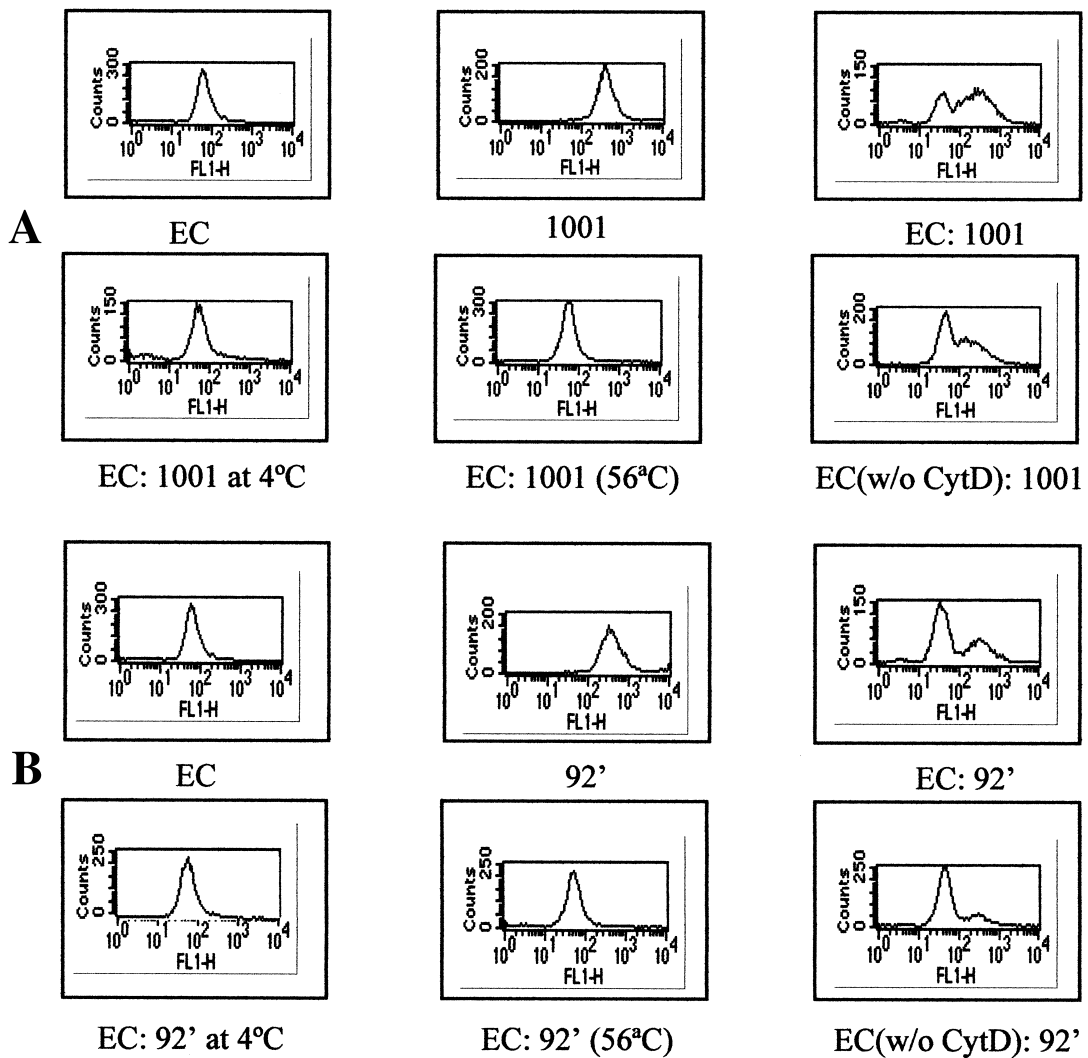


Fig. 4. Flow cytometric assay of adherence of *C. albicans* 1001 (A) and 92' (B) to Henle-407 cells. Henle-407 (EC) and labelled yeasts, serving as controls, were incubated separately and analysed without gating. In the adherence reactions (EC: 1001 and EC: 92'), the parameters used to select the EC population were size and granularity (because of its higher size and complexity), 'gating out' non-adherent yeasts. Control experiments were defined as: 4°C (temperature of reaction); 56°C (inactivation of the yeast prior to the reaction) and w/o CytD (epithelial cells not treated with cytochalasin D).

inducing conditions (Fig. 1), was assayed in a mouse model of systemic candidiasis in inbred mice. Three strains of mice exhibiting different patterns of susceptibility to infection with *C. albicans* [20] were infected with four different doses of 1001 and 92' blastospores. After statistical analysis of the results obtained (Fig. 2, Table 1) *C. albicans* 92' can be considered to have extremely low virulence, signifi-

cantly lower, even, than other strains classified as avirulent [7,8].

The level of colonisation of this mutant strain was analysed. The organs studied were the brain and the kidneys, whose involvement in disseminated *Candida* infections in humans and in mice has been previously described [3,17]. The number of log CFU recovered from the kidneys after inoculation with *C. albicans*

1001 increased with the dose and with the susceptibility of the mouse strain (Table 1), this kind of behaviour is consistent with the data on fungal load reported in the literature. In contrast, the percentage of renal clearance and the log CFU of the mice injected with *C. albicans* 92' after 60 days (chronic infection) was always the same, regardless of the strain of mice used (Table 1). This type of behaviour is completely different from that observed by other authors [21], where C5-deficient mice showed higher levels of tissue colonisation. Histological analyses also revealed a fast clearance and the absence of tissue damage in both the kidneys and brains of the mice infected with strain 92' (Fig. 3). The reduced virulence and the rapid clearance of *C. albicans* 92' from kidneys observed in strains of mice with different Th-dependent responses suggest that recovery from 92' infection may be independent of the role played by Th1/Th2 cytokine patterns.

The low virulence of *C. albicans* 92' and its low level of organ colonisation might be due to poor tissue adhesion, as previously described for other mutant strains [11]. The vascular endothelium plays a critical role during the dissemination through the circulation, because blood-borne organisms probably adhere to and penetrate the endothelial cell lining of the blood vessels to gain access to the tissue parenchyma [22]. The results in Fig. 4 show that the 92' strain was able to adhere to epithelial cells, although to a lower extent than strain 1001. The accuracy of the assay was confirmed using different conditions [16] that reduced the adhesion capacity of both *C. albicans* strains. The greatest advantage of this flow cytometric method is that very low epithelial:yeast cell ratios can be used, avoiding the flawed conclusions that could be derived from experiments performed at high ratios, where yeast coadhesion might occur and be mismeasured as adhesion to epithelial cells [23].

Alone, this reduced adhesion capacity of strain 92' cannot explain the absence of virulence. The results obtained with cytochalasin D (an inhibitor of phagocytosis) [22], which allowed us to discern between internalisation-plus-killing and adhesion, indicated that epithelial phagocytosis as observed by flow cytometry was higher for the 92' strain; this, together with reduced adhesion capability of this strain, might

explain the reduced virulence and the lack of tissue damage in the infection by strain 92'. In forthcoming studies we plan to further investigate the phagocytosis of neutrophils and macrophages with both *C. albicans* strains (1001 and 92').

Given the low virulence, the reduced adhesion capacity and, probably, the higher susceptibility to phagocytosis of the 92' strain, we think that our mutant will be a good recipient for cloning genes involved both in morphological switching (in vitro) and in virulence (in vivo). In order to test this latter possibility, a preliminary experiment was carried out to mimic the injection of a pool of transformants from a library. Mice were injected with a low dose of strain 92' (known to produce clearance of the infection) together with 100 and 1000 cells of the wild-type strain. The only cells recovered from the kidneys corresponded to the wild-type, which is able to colonise tissues. We think that, using 92' as recipient strain, it might be possible to clone genes that allow yeast cells to maintain in different organs using a murine model of systemic candidiasis.

Acknowledgements

We thank Alicia Couso for her helpful technical assistance; Dr. José Luis González for his expert histological analysis; Dr. Rosalina Pomés for previous studies and Dr. Antonio Portolés for his help with the statistical analysis. This work was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS) (Spain) with Grant 97/0047-01.

References

- [1] Fox, J.L. (1993) Fungal infection rates are increasing. *ASM News* 10, 515–518.
- [2] Cutler, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 187–218.
- [3] Odds, F.C. (1988) *Candida* and candidosis. Baillière Tindall, London.
- [4] Kobayashi, S.D. and Cutler, J.E. (1998) *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol.* 6, 92–94.
- [5] Odds, F.C. (1994) *Candida* species and virulence. *ASM News* 60, 313–318.
- [6] Calderone, R.A., Cihlar, R.L., Lee, D.D., Hoberg, K. and Scheld, W.M. (1985) Yeast adhesion in the pathogenesis of

- endocarditis due to *Candida albicans*: studies with adherence-negative mutants. *J. Infect. Dis.* 152, 710–715.
- [7] Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939–949.
- [8] Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Marcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. and Thomas, D.Y. (1997) Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCl4p. *Curr. Biol.* 7, 539–546.
- [9] Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Marcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* 66, 2713–2721.
- [10] Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J., Odds, F.C. and Gow, N.A. (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7670–7675.
- [11] Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J. and Hostetter, M.K. (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* 279, 1355–1358.
- [12] Nombela, C., Pomés, R. and Gil, C. (1987) Protoplasts fusion hybrids from *Candida albicans* morphological mutants. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 15, 79–85.
- [13] Garrigues, J.C., De Fontenay, G.C., Linas, M.D., Lagente, M. and Seguela, J.P. (1994) New in vitro assay based on glucose consumption for determining itraconazole and amphotericin B activities against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2854–2862.
- [14] Romani, L., Mocci, S., Bietta, C., Lanfaloni, L., Puccetti, P. and Bistoni, F. (1991) Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infect. Immun.* 59, 4647–4654.
- [15] Romani, L., Mencacci, A., Grohmann, U., Mocci, S., Mosci, P., Puccetti, P. and Bistoni, F. (1992) Neutralizing antibodies to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J. Exp. Med.* 176, 19–25.
- [16] Polacheck, I., Antman, A., Barth, I., Sagi, E. and Giloh, H. (1995) Adherence of *Candida albicans* to epithelial cells: studies using fluorescently labelled yeasts and flow cytometry. *Microbiology* 141, 1523–1533.
- [17] Papadimitriou, J.M. and Ashman, R.B. (1986) The pathogenesis of acute systemic candidiasis in a susceptible inbred mouse strain. *J. Pathol.* 150, 257–265.
- [18] Díez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-García, F., Pla, J., Nombela, C. and Sánchez-Pérez, M. (1997) Reduced virulence of *Candida albicans* *MK1* mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect. Immun.* 65, 833–837.
- [19] Sobel, J.D. (1993) Candidal vulvovaginitis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 36, 153–165.
- [20] Ashman, R.B. and Papadimitriou, J.M. (1988) Murine candidiasis: strain dependence of host responses after immunization. *Immunol. Cell Biol.* 66, 231–237.
- [21] Ashman, R.B., Bolitho, E.M. and Papadimitriou, J.M. (1993) Patterns of resistance to *Candida albicans* in inbred mouse strains. *Immunol. Cell Biol.* 71, 221–225.
- [22] Filler, S.G., Swerdloff, J.N., Hobbs, C. and Luckett, P.M. (1995) Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63, 976–983.
- [23] Kennedy, M.J. (1990) Models for studying the role of fungal attachment in colonisation and pathogenesis. *Mycopathologia* 109, 123–137.